

Université de Montréal

**Le rôle de la MAPK non-conventionnelle ERK3 dans
le développement thymique**

par

Julien Sirois

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Avril 2012

© Julien Sirois, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Le rôle de la MAPK non-conventionnelle ERK3 dans
le développement thymique**

présenté par :
Julien Sirois

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Thibodeau
Président-rapporteur

Nathalie Labrecque
Directrice de recherche

Laurent Sabbagh
Membre du jury

RÉSUMÉ

Les premières cellules progénitrices lympho-myéloïdes (LMPP) entrent dans le thymus et commencent leur processus de différenciation au stade double négatif (DN, CD4⁻CD8⁻). Après un réarrangement fonctionnel de la chaîne β de leur récepteur des cellules T (RCT), les cellules reçoivent des signaux de différenciation, de prolifération, de survie et de sélection et passent au stade double positif (DP, CD4⁺CD8⁺). Ensuite, la chaîne α du RCT est réarrangée et testée via les sélections positive et négative. Si le RCT reçoit un signal ni trop fort, ni trop faible, les cellules passent au stade simple positif où elles exprimeront soit la molécule CD4 ou CD8. ERK3, une MAPK non-conventionnelle, joue un rôle important dans le développement thymique. Des études précédentes ont démontré qu'une déficience en ERK3 diminue de 50 % la cellularité thymique et de 75% le nombre de cellules simples positives CD4 (CD4SP). Nous avons posé comme hypothèses qu'il y a une augmentation de l'apoptose chez les thymocytes DP de souris *Erk3*^{-/-} et que cette déficience chez les thymocytes DP affecterait la sélection positive des cellules DP, réduisant ainsi le nombre de thymocytes CD4SP. Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons regardé les niveaux d'apoptose grâce à la cytométrie en flux et par immunohistochimie. Dans les deux cas, nous étions incapables de détecter une différence du niveau d'apoptose chez les thymocytes DP entre les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Ensuite, nous nous sommes posés la question suivante : La demi-vie des thymocytes DP *Erk3*^{-/-} était-elle plus courte que le type sauvage? La demi-vie des thymocytes DP a été mesurée à l'aide de l'étude des réarrangements secondaires de la chaîne α du RCT par PCR semi-quantitatif et à l'aide de cultures de thymus fœtaux. En effet, ERK3 semble important pour prolonger la demi-vie des thymocytes DP. Ensuite, nous avons utilisé des marqueurs cellulaires différentiels (CD69, CD5 et RCT) pour regarder si les thymocytes DP sont capables de passer la sélection positive. En effet, il y a moins de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} qui sont CD69^{fort}, CD5^{fort} et RCT^{fort}. Finalement, nous voulons savoir si les fonctions de ERK3 passent par MK5, son seul partenaire d'interaction connu à ce jour. Après la caractérisation du thymus de la souris *Mk5*^{-/-}, nous observons que seulement la réduction du nombre de thymocytes CD4SP est identique à celle des thymocytes CD4SP de la souris *Erk3*^{-/-}. En

conclusion, ces résultats révèlent des fonctions importantes pour la molécule ERK3 lors du processus de sélection positive, le maintien de la demi-vie des thymocytes DP et lors de la régulation de développement thymique de manière MK5-dépendante et -indépendante.

Mots clés : thymopoïèse, thymus, ERK3, MAPK non-conventionnelle, demi-vie DP, sélection positive, apoptose, MK5, CD4SP

ABSTRACT

Early thymic progenitor cells (ETP) enter the thymus and begin their differentiation process at the double negative (DN) stage, having no CD4 and CD8 expression. After a functional rearrangement of the β chain of the T-cell receptor (TCR), the cells receive differentiation, proliferation, survival, and selection signals and pass to the double positive (DP) stage and acquire the expression of CD4 and CD8 molecules. Then, the TCR α chain is rearranged and the fully composed TCR is tested through positive and negative selection. If the TCR receives a signal that is just right (not too strong or too weak), the cells pass to the single-positive stage by acquiring either the CD4 or CD8 molecule. ERK3, an unconventional MAPK, plays an important role in thymic development. Previous studies have shown that a deficiency in ERK3 decreases by 50% the total thymic cellularity and by 75% the number of CD4 single-positive cells (CD4SP). We hypothesized that there is an increase in apoptosis in DP thymocytes of *Erk3*^{-/-} mice for and that this deficiency would affect the positive selection of DP cells, resulting in a reduced number of CD4SP. To test the first hypothesis, we looked at apoptosis levels by flow cytometry and immunohistochemistry. In both cases, we were unable to detect a difference in the level of apoptosis in DP thymocytes from *Erk3*^{+/+} and *Erk3*^{-/-} mice. We then made a second assumption, that the half-life of *Erk3*^{-/-} DP thymocytes for was shorter, which was measured by secondary rearrangements of the RCT α chain by semi-quantitative PCR and cultures of fetal thymi. Indeed, ERK3 seems important to extend the half-life of DP thymocytes. Next, we used differential cell markers (CD69, CD5, and TCR) to see if the DP thymocytes are able to pass positive selection. Indeed, there are less DP thymocytes *Erk3*^{-/-} that are CD69^{hi}, CD5^{hi}, and TCR^{hi}. Finally, we wanted to know whether the functions of ERK3 passes through MK5, its only interacting partner known to date. After characterization of the thymus of *Mk5*^{-/-} mice, we observe that only the reduction of CD4SP thymocytes is identical to that of CD4SP thymocytes of *Erk3*^{-/-} mice. In conclusion, these results reveal important functions for the molecule ERK3 for maintaining the half-life of DP thymocytes, for the process of

positive selection and for regulating T-cell development in a MK5-dependent and -independent manner.

Key words : thymopoiesis, thymus, ERK3, unconventional MAPK, DP half-life, positive selection, apoptose, MK5, CD4SP

Table des matières

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xvii
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 MAP Kinase.....	2
1.1.1 Les MAP kinases conventionnelles.....	3
1.1.1.1 ERK1/2.....	4
1.1.1.1.1 Identification, structure et localisation.....	4
1.1.1.1.2 Activation et rôles biologiques.....	5
1.1.1.2 p38.....	6
1.1.1.2.1 Identification, structure et localisation.....	6
1.1.1.2.2 Activation et rôles biologiques.....	7
1.1.1.3 JNK.....	8
1.1.1.3.1 Identification, structure et localisation.....	8
1.1.1.3.2 Activation et rôles biologiques.....	9
1.1.1.4 ERK5.....	10
1.1.1.4.1 Identification, structure et localisation.....	10
1.1.1.4.2 Activation et rôles biologiques.....	10
1.1.2 Les MAP kinases non-conventionnelles.....	11
1.1.2.1 ERK3/4.....	12
1.1.2.1.1 Identification, structure et localisation.....	12
1.1.2.1.2 Activation et rôles biologiques.....	13
1.1.2.1.3 MK5, un substrat important de ERK3/4.....	15
1.1.2.2 ERK7/8.....	19
1.1.2.2.1 Identification, structure et localisation.....	19
1.1.2.2.2 Activation et rôles biologiques.....	20
1.1.2.3 NLK.....	20
1.1.2.3.1 Identification, structure et localisation.....	20
1.1.2.3.2 Activation et rôles biologiques.....	21
1.2 LE DÉVELOPPEMENT THYMIQUE.....	22
1.2.1 La colonisation du thymus.....	24
1.2.2 L'engagement vers la lignée lymphocytaire T.....	24

1.2.3 Le choix $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$	26
1.2.4 La recombinaison V(D)J.....	28
1.2.4.1 L'initiation de la recombinaison.....	29
1.2.4.2 La synapse de recombinaison.....	30
1.2.4.3 Le clivage des segments heptamère/espaceur (12 ou 23) /nanomère.....	31
1.2.4.4 Protection et apprêtement.....	32
1.2.4.5 La résolution du joint codant et du joint signal.....	34
1.2.5 La β -sélection chez les thymocytes double négatif.....	35
1.2.6 Les thymocytes double positif.....	36
1.2.6.1 La voie de signalisation du RCT.....	38
1.2.6.2 La sélection positive.....	39
1.2.6.3 La sélection négative.....	42
1.2.6.4 Les signaux distinguant la sélection positive de la sélection négative.....	44
1.2.7 Le choix CD4SP ou CD8SP.....	46
1.3 LE RÔLE DE ERK3 DANS LE DÉVELOPPEMENT THYMIQUE.....	49
1.4 PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSES.....	54
2. MÉTHODOLOGIE.....	57
2.1 Souris utilisées.....	58
2.2 Anticorps.....	58
2.3 Cytométrie en flux (marquage extracellulaire).....	58
2.4 Détection de la caspase-3 clivée par cytométrie en flux.....	59
2.5 Détection de la caspase-3 clivée par immunohistochimie.....	59
2.6 Coloration histologique à la hématoxyline et à l'éosine.....	60
2.7 Mort cellulaire <i>in vitro</i>	60
2.8 Culture de thymus fœtaux (FTOC).....	61
2.9 PCR semi-quantitatif pour les réarrangements secondaires de la chaîne α du RCT.....	61
2.10 Stimulation <i>in vitro</i> des thymocytes.....	62
2.11 Analyses statistiques.....	63
3. RÉSULTATS.....	63
3.1 Pourquoi y a-t-il moins de thymocytes DP chez la souris ERK3 déficiente ?.....	64
3.1.1 Analyse du développement thymique au jour embryonnaire 19 (E19) en absence de ERK3.....	64
3.1.2 Est-ce qu'il y a une augmentation de l'apoptose chez les thymocytes DP n'exprimant pas ERK3 ?.....	68
3.1.3 Est-ce que la demi-vie des thymocytes DP <i>Erk3</i> ^{-/-} est plus courte que chez les thymocytes de type sauvage ?.....	76
3.2 Pourquoi y a-t-il moins de thymocyte CD4SP chez la souris <i>Erk3</i> ^{-/-} ?.....	82
3.2.1 Est-ce qu'il y a un défaut de la sélection positive chez les thymocytes DP <i>Erk3</i> ^{-/-} ?.....	82
3.3 Est-ce que la fonction de ERK3 dans le thymus est médiée par MK5 ?.....	97
3.4 Est-ce que l'activité catalytique de ERK3 est importante pour médier sa fonction dans le thymus ?.....	101

4. DISCUSSION.....	104
4.1. Phénotypage des souris E19 <i>Erk3</i> ^{-/-} déficient E19.....	105
4.2 Diminution du nombre de thymocyts DP chez la souris <i>Erk3</i> ^{-/-}	106
4.3 Diminution du nombre de thymocytes CD4SP chez la souris <i>Erk3</i> ^{-/-}	110
4.4 Modèle.....	110
4.5 Est-ce que la fonction de ERK3 dans le thymus est médiée par MK5 ou par son activité catalytique ?.....	116
4.6 Conclusions.....	118
5. RÉFÉRENCES.....	120
6. ANNEXE.....	134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Rôles biologiques des MAPKAPK.....6

Tableau II. Noms et séquences d'amorce utilisés pour la PCR semi-quantitative des réarrangements secondaires du RCT α62

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1.</i> Voies de signalisation des MAPK conventionnelles et non-conventionnelles.....	2
<i>Figure 2.</i> Les voies de signalisation des MAPK activent les MAPKAPK.....	3
<i>Figure 3.</i> Schéma de la structure des MAPK conventionnelles.....	4
<i>Figure 4.</i> Schéma de la structure des MAPK non-conventionnelles.....	12
<i>Figure 5.</i> Schéma de la structure des MAPKAPK.....	16
<i>Figure 6.</i> Le développement des lymphocytes T.....	23
<i>Figure 7.</i> Localisation des thymocytes dans le thymus selon leur stade de développement.....	26
<i>Figure 8.</i> Schéma des loci RCT α , RCT β , RCT γ et RCT δ	28
<i>Figure 9.</i> Étapes de l'initiation de la recombinaison.....	30
<i>Figure 10.</i> Synapse de la recombinaison.....	31
<i>Figure 11.</i> Clivage des segments.....	31
<i>Figure 12.</i> Protection et apprêtement des brins d'ADN.....	33
<i>Figure 13.</i> Résolution du joint codant.....	34
<i>Figure 14.</i> Modèle cinétique de la signalisation lors du choix CD4SP-CD8SP.....	48
<i>Figure 15.</i> Diminution du nombre de thymocytes totaux, de thymocytes TDS et thymocytes CD4SP en absence de ERK3 au jour embryonnaire 19.....	67
<i>Figure 16.</i> Aucune différence du niveau apoptose détectée lors d'un marquage intracellulaire de la caspase-3 clivée chez les souris E19 <i>Erk3</i> ^{+/+} et <i>Erk3</i> ^{-/-}	69
<i>Figure 17.</i> Analyse histologique du thymus de souris E19 <i>Erk3</i> ^{-/-}	71
<i>Figure 18.</i> Aucune différence en apoptose mesurée par immunohistochimie entre la souris E19 déficiente pour ERK3 et la souris de type sauvage	73
<i>Figure 19.</i> Légère augmentation de l'apoptose chez les thymocytes DP <i>Erk3</i> ^{-/-} après 24 heures en culture	75

<i>Figure 20.</i> Aucune diminution accélérée du nombre de thymocytes DP <i>Erk3</i> ^{-/-} dans des cultures de thymus fœtaux de 6 jours	78
<i>Figure 21.</i> Diminution des réarrangements utilisant des régions V et J distaux chez les thymocytes <i>Erk3</i> ^{-/-}	80
<i>Figure 22.</i> Les souris RCT transgénique expriment un RCT très tôt dans leur développement.....	83
<i>Figure 23.</i> Diminution du nombre de thymocytes TDS et thymocytes CD4SP chez la souris E19 OT-II <i>Rag2</i> ^{-/-} <i>Erk3</i> ^{-/-}	84
<i>Figure 24.</i> Défaut de la sélection positive chez la souris transgénique OT-II <i>Rag2</i> ^{-/-} <i>Erk3</i> ^{-/-} déficiente	86
<i>Figure 25.</i> Plus de thymocytes DP et moins de thymocytes TDS et thymocytes CD8SP chez la souris E19 OT-I <i>Rag2</i> ^{-/-} <i>Erk3</i> ^{-/-}	89
<i>Figure 26.</i> Défaut de la sélection positive chez la souris transgénique OT-I <i>Rag2</i> ^{-/-} <i>Erk3</i> ^{-/-}	91
<i>Figure 27.</i> Défaut de la sélection positive chez la souris <i>Erk3</i> ^{-/-} non transgénique pour un RCT	93
<i>Figure 28.</i> Défaut de l'augmentation de l'expression des molécules CD69 et CD5 chez les thymocytes DP et CD8SP OT-I <i>Rag2</i> ^{-/-} <i>Erk3</i> ^{-/-} suite à une stimulation du RCT	94
<i>Figure 29.</i> Défaut de l'augmentation de l'expression des molécules CD69 et CD5 chez les thymocytes DP et CD4SP OT-II <i>Rag2</i> ^{-/-} <i>Erk3</i> ^{-/-} suite à une stimulation du RCT	95
<i>Figure 30.</i> Défaut de l'augmentation de l'expression des molécules CD69 et CD5 chez les thymocytes DP et CD4SP <i>Erk3</i> ^{-/-} non RCT transgénique suite à une stimulation du RCT	97
<i>Figure 31.</i> Défaut de différenciation des thymocytes CD4SP chez la souris E19 <i>Mk5</i> ^{-/-}	98
<i>Figure 32.</i> Défaut de la sélection positive chez la souris <i>Mk5</i> ^{-/-}	100
<i>Figure 33.</i> La différenciation thymique est normale chez la souris <i>Erk3</i> ^{ki/ki} adulte	102
<i>Figure 34.</i> Modèle expliquant le rôle de ERK3 dans le développement thymique.....	115

<i>Figure 35.</i> Cellularité réduite et différenciation défectueuse des thymocytes CD4SP chez la souris <i>Erk3</i> ^{-/-} nouveau-nés.....	135
<i>Figure 36.</i> Le défaut du développement thymique en absence d'ERK3 est intrinsèque au thymus	136
<i>Figure 37.</i> Augmentation de l'apoptose des thymocytes DP chez les souris <i>Erk3</i> ^{-/-}	137
<i>Figure 38.</i> Accumulation des bris double brin de l'ADN chez les thymocytes DP <i>Erk3</i> ^{-/-}	138

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a. : acide aminé

Ala : Alanine

CD : Cluster Of Differentiation

CDK : Cyclin Dependant Kinase

DMBA : di-methylbenzanthracene

DN : Double Négatif

DP : Double Positif

E19 : jour embryonnaire 19

EGF : Epidermal Growth Factor

ERK : Extracellular-Regulated-Kinase

ETP : Early thymic Progenitors

FBS : Fetal Bovin Serum (Sérum de bovin feotal)

FTOC : Fetal Thymic Organ Culture

Gbr2 : Growth factor receptor-bound protein 2

GDP : Guanosine Di-Phosphate

GEF : Guanine Nucleotide Exchange Factor

Glu : Glutamate

Gly : Glycine

GPCR : G-Protein Coupled Receptor

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

His : Histamine

IL-1 : Interleukine-1

JNK : c-Jun NH₂-terminal Kinase

kDa : kiloDalton

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase

MAPKK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase

MAPKKK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

MK : MAPK-Activated Protein Kinase

MK5 ou PRAK : p38 Regulated/Activated Kinase

MNK : MAPK-interacting Kinase

MSK : Mitogen- and Stress-Activated Kinase

NES : Nuclear Export Sequence

NGF : Nerve Growth Factor

NLK : Nemo-Like Kinase

NLS : Séquence de localisation nucléaire

PAK : p21-activated Kinase

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGF : Platelet-derived Growth Factor

PTB : Phosphotyrosine Binding

RCT : Récepteur de Cellules T

RSK : p90 Ribosomal S6 Kinase

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

SAPK : Stress-Activated Protein Kinase

SH2 : Scr Homology 2

SOS : Son Of Sevenless

SP : Simple Positif

TAD : Domaine de transactivation

TAO : Thousand And One Kinase

Thr : Thréonine

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TRAF : Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor

Tyr : Tyrosine

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier très sincèrement ma directrice de recherche Nathalie Labrecque pour m'avoir accepté comme étudiant. J'ai bien aimé nos rencontres et nos nombreuses discussions. J'ai appris beaucoup au cours de mes 2 années passées dans le laboratoire 9-10 (et un petit moment dans le laboratoire de la Chaire Wolfe). Nathalie, tu m'as transmise ta passion pour l'immunologie et la recherche, et pour cela je te remercie.

Par la suite, j'aimerais remercier la gang du labo 9-10, que j'ai eu l'immense plaisir de côtoyer pendant ces deux années : Marc-André Benoit, Salix Boulet, Natacha Cotta, Jean-François Daudelin, Léa Gaudot, Mélusine Kiener, Julie Leignadier, Mélissa Mathieu, Miriam Marquis, Julie Rooney et Pamela Thébault. Je vais m'ennuyer du temps où l'on parlait de hockey et des maudits Bruins ! Merci du fond du cœur !

Pour continuer, je voudrais remercier Adam-Nicolas Pelletier, Simon-David Gauthier et Vincent Rajotte avec qui j'ai pris une petite bière de temps en temps pour me détendre du monde stressant de la recherche.

J'aimerais remercier tout le personnel du centre de recherche, qui a contribué de proche ou de loin, à ma recherche.

Ensuite, je tiens à remercier les membres de mon jury qui ont accepté avec plaisir d'évaluer ce mémoire.

Finalement, j'aimerais remercier ma conjointe, Dominique, avec qui j'ai l'honneur de partager ma vie et qui m'a toujours soutenu pendant cette aventure. J'aimerais remercier mes parents, Teresa et Serge, pour l'encouragement et pour les nombreux BBQ qui ont su me détendre.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 MAP KINASE

La voie des protéines kinase activées par les mitogènes (MAPK) est parmi les voies de signalisation intracellulaire les plus utilisées pour convertir des stimuli extracellulaires tels que le stress, les cytokines inflammatoires et les facteurs de croissance en signaux intracellulaires. Ces différentes protéines sont conservées tout au long de l'évolution, de la cellule eucaryote la plus primitive allant jusqu'à la cellule eucaryote des mammifères actuelles. Tous les eucaryotes possèdent plusieurs voies des MAPK, qui régulent une multitude de fonctions cellulaires, dont les processus métaboliques, la survie, l'apoptose, la motilité et les processus de différenciation ¹⁻⁴. Les MAPK sont classifiées selon leur structure, leur capacité de phosphorylation et d'activation (Figure 1) ^{5,6}. Le grand nombre de fonctions qu'exercent les MAPK est médié par la phosphorylation de plusieurs substrats incluant les MAPK-activated protein kinase (MAPKAPK), ou les protéines kinases activées par les MAPK. Ces substrats sont divisés en 5 grands groupes : RSK, MSK, MNK, MK2/3 et MK5 (Figure 2) ⁶. Dans cette partie du mémoire, je vais vous décrire les différents groupes de MAPK, en commençant par le groupe des MAPK conventionnelles, comprenant ERK1/2, p38, JNK et ERK5 et en terminant par le groupe de MAPK non-conventionnelles, comprenant ERK3/4, ERK7/8 et NLK.

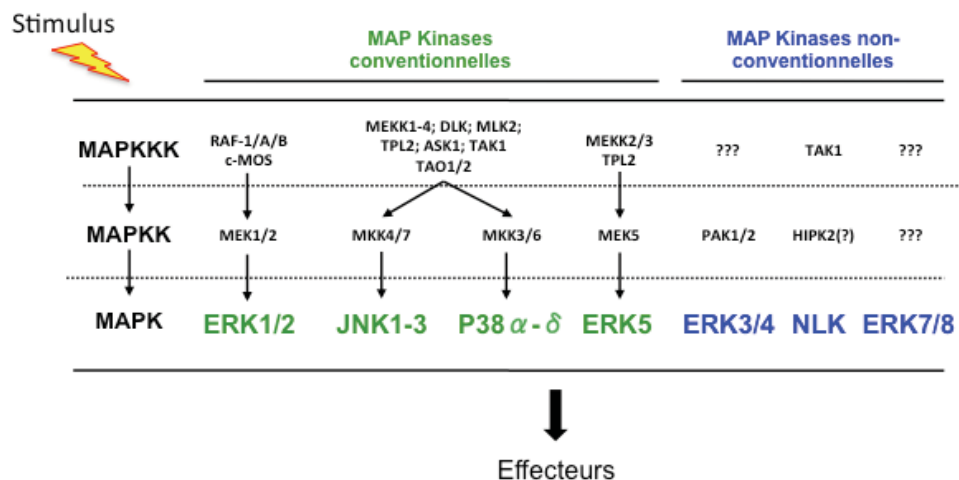


Figure 1. Voies de signalisation des MAPK conventionnelles et non-conventionnelles.
Adapté de ^{5,6}

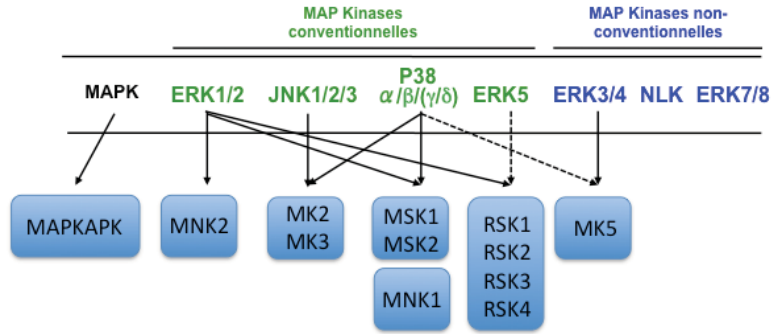


Figure 2. Les voies de signalisation des MAPK activent les MAPKAPK. Les isoformes de p38 entre parenthèses signifient qu'il n'existe aucune évidence sur leur rôle lors de l'activation des MAPKAPK. Les lignes discontinues signifient que cette MAPK peut phosphoryler une MAPKAPK, mais qu'il faudrait plus d'études pour pouvoir le confirmer. Adapté de ⁶.

1.1.1 Les MAP kinases conventionnelles

Au total, 14 MAPK ont été identifiées jusqu'à présent chez les mammifères. De ce nombre, 10 constituent le groupe appelé MAPK conventionnelles. Ce dernier comprend également plusieurs sous-groupes : extracellular signal-regulator kinases (ERK1/2), c-Jun amino (N)-terminal kinases (JNK1/2/3), les différents isoformes de p38 (α , β , γ et δ) et ERK5 ^{6,7}. Chaque MAPK conventionnelle est trouvée à la fin d'une série de kinases, qui agissent de façon séquentielle, la cascade de kinases. Les MAPKK kinases activent les MAPK kinases qui activent à leur tour les MAP kinases. Les MAPKKK sont souvent phosphorylées suite à l'interaction avec des protéines G de la famille Ras/Rho suite à un stimulus extracellulaire. Donc, une activation de MAPKKK phosphoryle une MAPKK qui ensuite phosphoryle à son tour une MAPK, dans sa boucle d'activation. La phosphorylation de la boucle d'activation est essentielle pour l'activité enzymatique de la MAPK ². Cette cascade de kinase est, en quelque sorte, responsable de l'amplification du signal de départ. Bien que chaque MAPK conventionnelle soit semblable, elles diffèrent par les acides aminés (a.a.) situés dans leur boucle d'activation. Cependant, les a.a. suivent le même motif général, c'est-à-dire que le motif débute toujours par la thréonine et finit par une tyrosine (Thr-Xaa-Tyr) (Figure 3). Ce motif conservé au cours de l'évolution est très

important pour permettre l'activation de nombreux substrats. Dans la section suivante, je vais décrire les différentes MAPK conventionnelles, en parlant de leur découverte, leur structure, leur localisation, leurs substrats et leurs rôles biologiques.

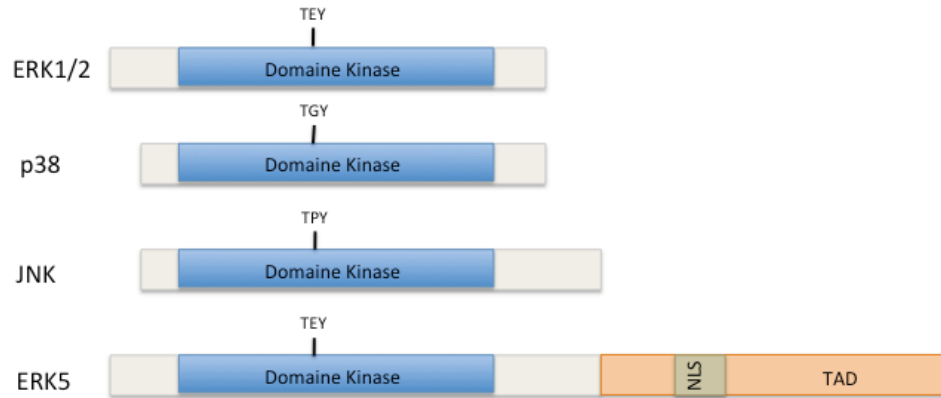


Figure 3. Schéma de la structure des MAPK conventionnelles. Bleu : domaine kinase; gris : extension N- et C- terminales; TAD : domaine de transactivation; NLS : séquence de localisation nucléaire. Le motif de phosphorylation du domaine kinase est montré pour chaque MAPK conventionnelles. Adapté de ⁶.

1.1.1.1 ERK1/2

1.1.1.1.1 Identification, structure et localisation

ERK1 a été la première MAPK à être clonée et caractérisée au début des années 1990 par le laboratoire du Dr Cobb ⁸. Cette protéine a été identifiée grâce à la phosphorylation de ses résidus tyrosine et thréonine par des facteurs de croissance. Par la suite l'ADN complémentaire de ERK1 et de ERK2 a pu être cloné ⁸. ERK1 et ERK2 partagent une identité en a.a. de 83% et leur poids moléculaire respectif est de 43 kDa et 41 kDa ^{7,8}. ERK1/2 sont exprimées dans un grand nombre de tissus et organes, dont le cerveau, les muscles squelettiques, le cœur et le thymus ⁶⁻⁸. Plusieurs isoformes de ERK1/2 ont été identifiées (ERK1b, ERK1c et ERK2b) jusqu'à ce jour et leurs fonctions dépendent de leur localisation tissulaire ⁹⁻¹².

1.1.1.1.2 Activation et rôles biologiques

Les MAPK ERK1/2 sont activées par un vaste nombre de facteurs de croissance, tel que les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF), les facteurs de croissance épidermiques (EGF) et les facteurs de croissance neuronaux (NGF). De plus, ERK1/2 peuvent être activées en réponse à l'insuline ⁶. ERK1/2 est principalement activée par des récepteurs tyrosine kinase (RTK) à la surface de la cellule. Lorsqu'un ligand interagit avec son récepteur, il y a une dimérisation des récepteurs. Ceci provoque une activation du récepteur et une autophosphorylation des résidus tyrosine dans le domaine intracellulaire. Ces résidus phosphorylés permettent le recrutement de protéines qui ont des domaines SH2 (Src homology 2) ou PTB (phosphotyrosine binding). Une des molécules recrutées la plus étudiées et qui est importante pour la transduction du signal vers ERK1/2 est Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2). L'activation de ERK1/2 via Ras commence à la membrane plasmique et est contrôlée par une GEF (guanine nucleotide exchange factor), SOS (son of sevenless). SOS est recrutée à la membrane plasmique et interagit avec Grb2 pour ensuite stimuler l'échange du GDP (guanosine di-phosphate) en GTP (guanosine tri-phosphate). Ceci est important pour la régulation de l'activité de Ras. Ce dernier peut alors interagir avec un de ces effecteurs, Raf, pour mener ensuite, à l'activation de la voie de ERK1/2 sur leur motif d'activation Thr-Glu-Tyr (TEY) via des MAPKK, MEK1 et MEK2 ^{6,7,13}. La régulation étroite de Ras et Raf est cruciale pour une prolifération cellulaire normale, puisque les mutations de ces gènes peuvent donner naissance à des tumeurs ¹⁴.

Lorsqu'une cellule est au repos, ERK1/2 sont localisées principalement dans le cytoplasme. Cependant, après une stimulation, la grande majorité des protéines se dirigent vers le noyau ^{15,16}. Tout récemment, un nouveau mode de translocation nucléaire a été identifié. En effet, le domaine kinase de ces protéines contient une séquence qui s'appelle NTS, ou séquence de translocation nucléaire. Ce domaine est phosphorylé en même temps que l'activation de ERK1/2, ce qui permet à ERK1/2 d'aller au noyau via des pores nucléaires ¹⁷. Après stimulation, ERK1/2 peuvent

phosphoryler un grand nombre de substrats : RSK, MNK, NF-AT, Elk-1, c-Fos, c-Myc, STAT3, Syk et plusieurs autres ¹⁸.

Les MAPK ERK1/2 jouent un rôle particulièrement important lors de la prolifération cellulaire. Pour avoir une progression efficace du cycle cellulaire, entre autre, la progression G₁-S du cycle cellulaire, l'activation de ERK1/2 doit être soutenue. Cette activité soutenue permet l'expression de la cycline D1 via l'expression des protéines AP-1 ¹⁹. De plus, les MAPK ERK1/2 activent les MAPKAPK RSK, MSK et MNK, qui sont responsable de plusieurs autres fonctions biologiques. Les rôles biologiques de chaque MAPKAPK sont présentés dans le tableau I. Le rôle de MK5 sera discuté avec plus de détails un peu plus loin dans ce mémoire.

Tableau I. Rôles biologiques des MAPKAPK. Adapté de ⁶.

RSK1/4	MSK1/2	MNK1/2	MK2/3	MK5
Transcription de gène	Transcription de gène	Traduction de l'ARNm	Remodelage de l'actine	Remodelage de l'actine
Prolifération cellulaire	Réponse nucléosomale		Migration cellulaire	Suppresseur de tumeur
Croissance cellulaire			Production de cytokines	
Survie cellulaire			Transcription de gène	
			Contrôle du cycle cellulaire	

1.1.1.2 p38

1.1.1.2.1 Identification, structure et localisation

La MAPK p38 α a été découverte en 1994 par 3 groupes indépendants. Cette MAPK est activée par le stress cellulaire ²⁰. La MAPK p38 possède une homologie de 50% avec ERK2. Depuis l'identification de p38 α , 3 autres isoformes ont été caractérisées. On les appelle p38 β , p38 γ et p38 δ ²¹. Les isoformes p38 α et p38 β sont présents de façon ubiquitaire dans de nombreux tissus et nombreuses lignées cellulaires.

Cependant, le patron d'expression des autres isoformes, p38 γ et p38 δ semble être un peu plus restrictif (tissu des muscles squelettiques pour p38 γ et l'épiderme pour p38 δ). De plus, ces isoformes ont possiblement des rôles différents et plus spécifiques que p38 α et p38 β ²². L'isoforme la plus exprimée semble être l'isoforme p38 α et la majorité des études portent plus spécifiquement sur cette molécule.

1.1.1.2.2 Activation et rôles biologiques

Dans les cellules de mammifères, les 4 isoformes sont fortement exprimées suite à de nombreux stimuli extracellulaires. Ces stimuli comprennent les stress cellulaires (stress oxydatif, les radiations ultraviolets, l'hypoxie) et les cytokines inflammatoires (Interleukine-1 (IL-1), facteur de tumeur nécrotique α (TNF α) ²¹. TNF α et IL-1 activent p38 via le recrutement des protéines adaptatrices TRAF au domaine intracellulaire des récepteurs au TNF- α et IL-1 ²³. Ce recrutement permet l'activation de MAPKKK impliquée dans l'activation de p38. p38 peut également être activé par d'autres molécules, dont les récepteurs couplés à des protéines G (GPCR) ²⁴ et les GTPases de la famille Rho, Rac et Cdc42 ²⁵. Ensuite, les MAPKKK activent à leur tour des MAPKK, MKK3 et MKK6 ^{26,27}. Récemment, il a été démontré que MKK4 avait la possibilité d'activer p38 ²⁸. MKK6 est capable de phosphoryler tous les isoformes tandis que MKK3 active uniquement les isoformes p38 α , p38 γ et p38 δ . L'activation des différents isoformes de p38 par les MAPKK se fait sur le motif Thr-Gly-Tyr situé dans leur boucle d'activation, hautement conservée parmi les MAPK conventionnelles ²¹.

Les isoformes de p38 sont présents dans le cytoplasme et le noyau de cellules au repos ²⁹. Lorsqu'une cellule reçoit des signaux de stress, p38 s'accumule dans le noyau ³⁰. À ce jour, les mécanismes de transport de p38 du cytoplasme vers le noyau demeurent inconnus. Toutefois, des MAPKAPK, dont MK2 et MK3 semblent jouer un rôle dans ce transport ³¹. Une fois activé, p38 a la possibilité de phosphoryler un

vaste nombre de molécules (cPLA2, MNK1/2, MK2/3, HuR, Bax, Tau, ATF1/2/6, MEF2, Elk-1, GADD153, Ets1, p53 et MSK1/2)²¹.

La MAPK p38 joue un rôle important dans la prolifération et survie cellulaire. p38 régule de façon négative la progression du cycle cellulaire lors des transition G₁-S et G₂-M. Ce processus est provoqué par la diminution de l'expression des cyclines et l'augmentation de l'expression des inhibiteurs CDK³². Plusieurs études placent p38 dans la catégorie de molécules pro-survie. Cependant, une autre fonction de p38 est l'augmentation de l'apoptose des cellules en réponse au stress par des mécanismes transcriptionnels et posttranscriptionnels. Ces mécanismes à leur tour affectent des récepteurs participant à la mort cellulaire, les voies de survie cellulaire et les protéines pro et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2³³. Finalement, p38 peut continuer la cascade de kinase en phosphorylant des MAPKAPK, dont MSK, MNK1, MK2/3 et MK5⁶. Les rôles biologiques de chaque MAPKAPK sont présentés dans le Tableau I.

1.1.1.3 JNK

1.1.1.3.1 Identification, structure et localisation

La première protéine faisant parti de la famille des kinases JNK a été découverte au début des années 1990. Elle a été identifiée comme une MAP-2 kinase activée par le cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique chez les cellules eucaryotes³⁴. De plus, elle a été isolée grâce à une technique de purification par affinité en utilisant la protéine c-Jun sur des billes³⁵. Par la suite, il a été démontré que ce sont principalement les stress cellulaires qui induisaient la phosphorylation de JNK sur les résidus thréonine et tyrosine dans son domaine kinase, tout comme les autres MAPK conventionnelles^{36,37}. La famille de kinases JNK comprend trois isoformes, JNK1, JNK2 et JNK3 qui ont été clonées au milieu des années 1990 par 2 groupes indépendants³⁸. Les membres de la famille JNK ont une homologie de 85% entre eux.

1.1.1.3.2 Activation et rôles biologiques

Tout comme les isoformes de la MAPK p38, les isoformes de JNK sont activées par le stress cellulaire, d'où leur nom alternatif, les protéines kinases activées par les stress (SAPK). Ces stress incluent les chocs thermiques, les radiations ionisantes et ultraviolet, le stress oxydatif, les agents qui endommagent l'ADN, les inhibiteurs de la synthèse de protéines et plusieurs autres ³⁹. L'activation de JNK survient lorsque les résidus thréonine et tyrosine, situés dans le domaine kinase hautement conservé, sont phosphorylés. Les MAPKK qui phosphorylent JNK se nomment MKK4 et MKK7. Ces dernières sont phosphorylées et activées par des MAPKKK, dont MEKK1-4, MLK1-3, Tpl-2, DLK, TAO1/2, TAK1 et ASK1/2 ^{4,40}.

Les MAPK JNK sont principalement situées dans le cytoplasme des cellules. Après stimulation, JNK se retrouve alors dans le noyau, comme les MAPK ERK1/2 et p38 ⁴¹. Le substrat le plus connu et le mieux caractérisé pour JNK est c-Jun. Des études ont montré qu'une phosphorylation soutenue de JNK sur les sérines 63 et 73 augmentait l'activité de c-Jun ⁴². Des études plus récentes ont voulu démontrer la participation de chaque isoforme de JNK quant à l'activation de c-Jun. Elles ont démontré que JNK1 et JNK2 sont des régulateurs positifs de c-Jun. De plus, JNK1 et JNK2 joueraient un rôle important lors de la prolifération cellulaire ^{43,44}. Au fil des années, plusieurs autres facteurs de transcription ont été ajoutés à la liste de protéines phosphorylées par JNK, dont p53, ATF-2, NF-ATc1, Elk-1, HSF-1, STAT3, c-Myc et JunB ^{13,39}. Cependant, la contribution de chaque isoforme sur ces facteurs de transcription n'est pas connue. Finalement, JNK1 et JNK2 sont connus pour jouer un rôle important dans le bon maintien de la prolifération cellulaire. Lorsque c-Jun est phosphorylé par JNK, AP-1 est activé et provoque l'assemblage d'un complexe qui permet l'activation de gènes importants pour le cycle cellulaire, dont la cycline D1 ⁴⁴. De plus, JNK1 et JNK2 ont été démontrés comme jouant un rôle lors de l'induction des mécanismes d'apoptose chez les cellules qui subissent des stress ⁴⁵.

1.1.1.4 ERK5

1.1.1.4.1 Identification, structure et localisation

ERK5 a été découvert par 3 groupes indépendants au milieu des années 1990 ⁴⁶⁻⁴⁸. Cette protéine a la plus grosse masse moléculaire de toutes les MAPK conventionnelles, environ 100 kDa. Son domaine kinase a une homologie de 51 % avec ERK2. ERK5 a une extrémité C-terminale unique qui contient un signal de localisation nucléaire (NLS). De plus, cette extrémité a la particularité d'être riche en résidus proline. Jusqu'à ce jour, 3 protéines différentes (ERK5a, ERK5b et ERK5c) ont été identifiées grâce à l'épissage alternatif de ERK5 ⁴⁹. ERK5 est exprimée dans la plupart des tissus, mais de hauts niveaux de ERK5 ont été trouvés dans le cerveau, le thymus et la rate ⁵⁰.

1.1.1.4.2 Activation et rôles biologiques

L'activation de ERK5 est induite par plusieurs stimuli extracellulaires, dont les facteurs de croissance, le sérum, le stress oxydatif et l'hyperosmolarité ⁵¹. Ceci est corrélé avec la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine dans la boucle d'activation du domaine kinase par MEK5, la seule MAPKK capable de faire cette phosphorylation ^{46,52}. MEK5 est phosphorylée et activée par MEKK2 et MEKK3, des MAPKKK. Cependant, cette voie n'est pas seulement spécifique à ERK5, car MEKK2 active également les MAPK JNK et p38 ⁵¹. Finalement, dans une étude publiée en 2003, le groupe de Melanie Cobb a découvert un candidat potentiel en amont de MEKK2/3, la kinase WNK1 ⁵³.

ERK5 est localisée dans le cytoplasme des cellules. Après stimulation ou l'activation de MEK5, ERK5 se dirige vers le noyau pour effectuer ses fonctions ⁵¹. Au fil du temps, plusieurs substrats de ERK5 ont été identifiés : MEF2, Sap1a, c-Myc, SGK, Cx43 et Bad ^{51,54}.

Il a été démontré, qu'au niveau cellulaire, ERK5 joue un rôle dans la survie et la prolifération cellulaire. Tout comme ERK1/2, ERK5 agit sur la transition G₁/S en activant l'expression de la cycline D1 ⁵⁵. Finalement, ERK5 est capable d'augmenter la cascade de kinase en phosphorylant la famille de kinase RSK ⁵⁶.

1.1.2 Les MAP kinases non-conventionnelles

Les mécanismes d'activation des MAPK non-conventionnelles sont peu connus, puisque ces dernières ne partagent pas les mêmes caractéristiques que les MAPK conventionnelles ⁵. Ces MAPK non-conventionnelles ne font pas parties de cascades de kinase connues. Cependant, de plus en plus d'études commencent à décrire les candidats potentiels pour l'activation de ces MAPK atypiques. Ensuite, le motif d'activation Thr-Xaa-Tyr dans le domaine kinase est absent chez ERK3/4 et NLK ^{5,6}. Le résidu Tyr est remplacé soit par un résidu Gly ou Glu. Dans le cas de ERK7, cette MAPK atypique possède la même boucle d'activation que les MAPK conventionnelles. Toutefois, l'activation de cette protéine provient par autophosphorylation et non par une voie classique d'activation (MAPKKKK → MAPKK → MAPK) ^{5,6}. Certaines MAPK non-conventionnelles possèdent également une extension C-terminale avec des fonctions peu connues à ce jour ^{5,6}. Récemment, plusieurs groupes de chercheurs ont trouvé des substrats et fonctions biologiques uniques à ces protéines ⁵. Dans cette partie du mémoire, je vais décrire le fascinant monde des MAPK non-conventionnelles, ERK3/4, ERK7/8 et NLK, en décrivant leur découverte, leur structure, leur localisation, leurs substrats et leurs rôles biologiques.

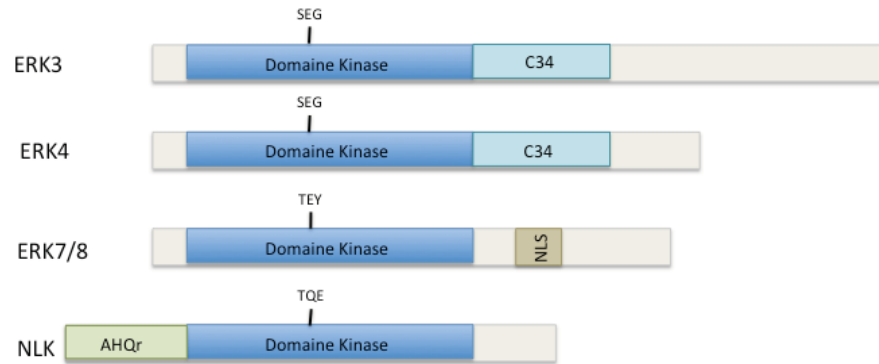


Figure 4. Schéma de la structure des MAPK non-conventionnelles. Bleu : domaine kinase; gris : extension N- et C- terminales; NLS : séquence de localisation nucléaire; C34 : domaine conservé chez ERK3 et ERK4; AHQr : domaine riche en Ala, His et Glu. Le motif de phosphorylation du domaine kinase est montré pour chaque MAPK non-conventionnelles. Adapté de ⁶.

1.1.2.1 ERK3/4

1.1.2.1.1 Identification, structure et localisation

ERK3 a été cloné pour la première fois en 1991 grâce à une librairie d'ADNc dérivés de ERK1 ⁶. Des études ont par après été en mesure de mieux caractériser ERK3, comme la découverte de ERK3 chez l'humain, au milieu des années 1990, et chez la souris au début des années 2000. ERK3 possède une extension C-terminal (178 acides aminés) et a une masse moléculaire d'environ 100 kDa ⁵⁷. De plus, avec la même méthode, des chercheurs ont pu isoler ERK4, une protéine ayant une masse moléculaire d'environ 70 kDa ⁵. ERK3 et ERK4 sont très similaires entre eux, possédant une homologie de 73% dans leur domaine kinase. ERK3/4 font partie du groupe des MAPK non-conventionnelles puisque le motif de la boucle d'activation du domaine kinase n'inclut pas un résidu tyrosine et contient le motif Ser-Glu-Gly. Le rôle précis de l'extension C-terminale n'est pas très connu à ce jour, toutefois, il a été démontré que cette partie joue un rôle dans le ciblage intracellulaire ⁵⁸. La partie N-terminale de ERK3 participe à la dégradation de cette dernière par la voie de l'ubiquitination/protéasome ⁵⁹. ERK3 est exprimée dans de nombreux tissus et lignées cellulaires. En effet, le niveau d'ARNm d'EKR3 varie beaucoup d'un endroit

à l'autre avec des niveaux plus élevés dans les cellules du cerveau et de l'intestin ⁶⁰. ERK4 est également retrouvée dans une multitude de tissus allant du cœur, du placenta, au rein. Cependant, les niveaux d'ARNm d'ERK4 demeurent plus élevés dans le cerveau ⁶¹. Au niveau cellulaire, ERK3 est située à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau et ce, indépendamment du stimulus que la cellule reçoit ⁵. Dans le cas de ERK4, elle est majoritairement localisée dans le cytoplasme ⁵.

1.1.2.1.2 Activation et rôles biologiques

Le mode d'activation de ERK3/4 demeure à ce jour très peu connu. Toutefois, l'expression de ERK3 peut être régulé de deux façons : soit de façon transcriptionnelle, ou soit de façon post-traductionnelle ⁵. De plus, il a été démontré qu'ERK3 joue des rôles biologiques très importants, dont la prolifération cellulaire, la progression du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire ^{5,58,62}. En 2003, une étude très importante a été publiée par le groupe de Meloche. En effet, ERK3 est une protéine très instable et sa demi-vie est d'environ 30 minutes dans les cellules en prolifération exponentielle ⁶². Cette instabilité protéique est le résultat de la dégradation active de ERK3 par la voie ubiquitine-protéasome chez les cellules en prolifération ⁶². Ce sont deux domaines de dégradation, situés dans sa partie N-terminale, qui sont essentiels et suffisants pour la poly-ubiquitination et la protéolyse de ERK3 via le protéasome 26S ⁶². De plus, l'équipe de Meloche a aussi observé que ERK3 est stabilisé et s'accumule abondamment chez deux lignées cellulaires en différenciation, les lignées cellulaires PC12 (provenant du rat) et C2C12 (myoblastes de souris), suggérant un rôle possible de ERK3 lors du retrait du cycle cellulaire de la cellule ⁶⁰. Plusieurs études ont démontré que ERK3 pouvait être phosphorylée sur son résidu sérine ^{5,63}. De plus, cette phosphorylation est constitutive, étant indépendante de stimuli extracellulaires ⁵.

Des études récentes ont démontré qu'en élimant ERK3 chez la souris, cette dernière avait des complications au niveau de l'embryogénèse et que ces complications ne permettent pas à la souris de survivre à la naissance ⁶⁴. En effet, cette létalité est

causée par une malformation de l'épithélium des poumons, provoquant ainsi une hypoplasie pulmonaire. Donc, ERK3 semble jouer un rôle très important lors de l'embryogénèse ⁶⁵. Il a été suggéré qu'ERK3 jouerait un rôle de régulateur négatif de la prolifération cellulaire ^{57,60}. En effet, ERK3 régule négativement le cycle cellulaire que lorsque cette protéine passe du cytoplasme au noyau d'une cellule et vice versa. En séquestrant ERK3 soit dans le noyau ou soit dans le cytoplasme, l'activité de ERK3, qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase S, était réduit. L'activité de ERK3 semble être important dans le cas où elle est distribuée dans la cellule et non séquestrée dans un compartiment spécifique. De plus, la phosphorylation du domaine C-terminal et la stabilité de ERK3 sont régulées par la kinase, Cdk1, et la phosphatase, Cdc14. Ceci suggérant un rôle de ERK3 lors de la mitose, puisque Cdc14 déphosphoryle les résidus Ser/Thr de ERK3 ⁶⁶. Finalement, le rôle de ERK3 lors de la différenciation peut être apparié à son rôle d'arrêt de la prolifération cellulaire.

Très récemment, le groupe de Sylvain Meloche a identifié une voie possible menant à l'activation de ERK3. En effet, la phosphorylation de ERK3 dans la boucle d'activation est faite par p21-activated kinase (PAK). Ensuite, l'activation de ERK3 permet l'activation d'une MAPKAPK, MK5 ^{31,67}. MK5 est le seul substrat connu de ERK3/4 qui est phosphorylé par ce dernier ^{31,67}. De plus, le groupe de Beeser a pu confirmer la voie PAK/ERK3/MK5 grâce à l'utilisation d'inhibiteur de PAK ⁶⁸. Toutefois, MK5 demeure une protéine avec des fonctions très peu connues. Les caractéristiques de MK5 seront discutées un peu plus loin dans ce mémoire.

À ce jour, peu d'études portant sur le rôle biologique de ERK4 existent. Le groupe de Meloche a démontré que ERK4 jouerait un rôle important dans le cerveau chez la souris. En effet, le caractère d'une souris ayant un déficit en ERK4 semble indiquer des symptômes similaires à ceux de la dépression ^{5,69}. De plus, le groupe de Meloche a démontré qu'une déficience en ERK4 n'empirait pas le phénotype de la souris ERK3 déficiente, ce qui nous laisse penser que ERK3 et ERK4 ne jouent pas de rôles redondants ⁶³. Contrairement à ERK3, ERK4 demeure une protéine stable ⁶⁵.

Récemment, le groupe de Meloche a pu identifier que le résidu Ser186 est phosphorylé par les kinases PAK du groupe I, tout comme pour ERK3. De plus, cette activation semble jouer un rôle crucial pour la phosphorylation de MK5⁶³. Toutefois, d'autres études restent à venir pour élucider les activités biologiques de ERK4.

1.1.2.1.3 MK5, un substrat important de ERK3/4

Actuellement, les voies de signalisation de ERK3 et ERK4 commencent petit à petit à être élucidées. Un substrat fort intéressant a émergé au milieu des années 2000. MK5, ou mieux connu sous le nom de PRAK, a été découvert simultanément par deux groupes par la recherche de séquences homologues qui étaient partagées avec MK2^{70,71}. C'est en 2004 que deux groupes indépendants ont pu démontrer, pour la première fois, que MK5 est bel et bien un substrat de ERK3/4^{67,72}. L'équipe formée de Meloche, de Moens et de Keyse ont pu démontré une interaction entre MK5 et ERK3/4 grâce au système deux-hybride de levures, qui permet d'étudier des interactions protéines-protéines *in vivo*. À leur surprise, ils s'attendaient à voir une interaction entre MK5 et p38, mais ce qui a émergé est l'interaction MK5-ERK3/4⁶⁷. Le groupe de Gaestel a utilisé la même approche pour trouver une interaction entre ERK3 et MK5⁷².

MK5 a une structure protéique similaire à MK2/3, puisque MK5 contient un domaine kinase situé entre un petit côté N-terminal qui ne possède pas de domaine SH3 et un long côté C-terminal de 100 a.a. possédant un domaine NLS, un domaine NES et un domaine qui lie les MAPK. Le domaine NLS chevauche un site d'ancrage (Ile-Leu-Arg-Lys-Arg-Lys-Leu-Leu) qui interagit avec les MAPK p38 α et p38 β ⁷³. Cette interaction avec p38 semble être plus faible qu'avec MK2 et MK5 ne stabiliserait pas p38 *in vivo*⁷⁴. La séquence NES (Leu-Arg-Val-Ser-Leu-Arg-Pro-Leu-His-Ser) est également fonctionnelle et permet l'export nucléaire de façon CRM1-dépendant⁷³. Récemment, un autre site d'ancrage a été trouvé permettant de lier ERK3 et ERK4 à MK5⁷⁵ (Figure 5).

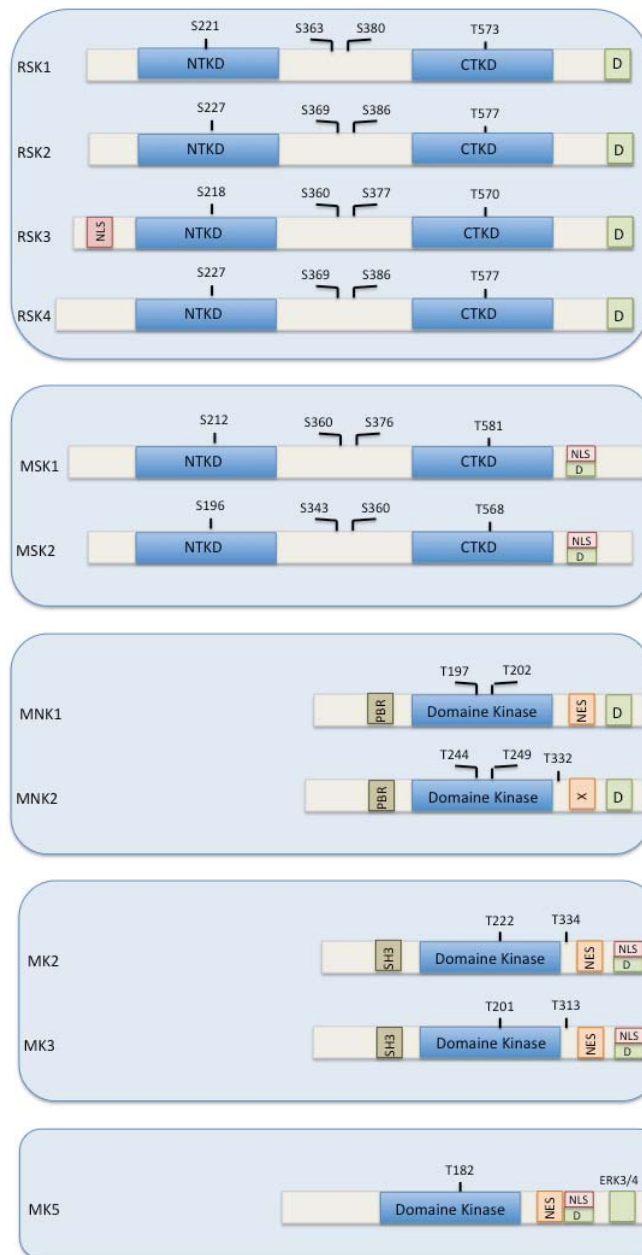


Figure 5. Schéma de la structure des MAPKAPK. La grande famille des MAPKAPK est divisée en 5 groupes : Les RSK, les MSK, les MNK, MK2/3 et MK5. Les groupes RSK et MSK possèdent deux domaines kinase différents. Les résidus pouvant être phosphorylés sont indiqués sur le schéma. NES : Nuclear Export signal; NLS : Nuclear localization signal; PBR : polybasic region; SH3 : Src homology 3 domain; X : domaine NES non-fonctionnel; D : domaine d'ancrage des MAPK; ERK3/4 : domaine d'ancrage pour ERK3/4; NTKD : N-terminal Kinase Domain; CTKD : C-terminal Kinase Domain. Adapté de ⁶.

L'expression de MK5 semble être ubiquitaire, avec des niveaux plus élevés dans le cœur, muscles squelettiques, le pancréas et les poumons ^{70,71,76}. Chez l'humain, il

existe 2 formes alternatives de MK5 et chez la souris, le gène *Mk5* code pour 4 protéines, produit par épissage alternatif et par suppression d'exons dans l'édition du pré-ARNm ⁷⁷.

Malgré le fait que MK5 est un proche parent de MK2/3, les mécanismes d'activation de MK5 sont totalement différents de MK2/3. Plusieurs études ont démontré, qu'en surexprimant MK5, p38 phosphoryle MK5 en réponse au stress ^{70,71,73,78}. De plus, des études *in vitro* ont démontré que p38 phosphoryle MK5 sur le résidu Thr182, ce qui est très important pour activer MK5 ⁷¹. Cependant, afin d'observer une interaction entre p38 et MK5, il faut surexprimer MK5 et jusqu'à ce jour aucune interaction entre p38 et MK5 endogène n'a été démontrée ^{67,74,79}.

Tout récemment, deux autres substrats de MK5 ont été identifiés, soit ERK3 et ERK4. Ces MAPK atypiques régulent l'activité de MK5 lorsque surexprimées ^{67,72}. Cependant, ce qui les différencie de p38, c'est que des études ont démontrées que cette interaction est possible même avec des niveaux physiologiques de MK5 ^{61,67,69,72}. En effet, l'activité de MK5 endogène est réduite chez les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) *Erk3*^{-/-} et *Erk4*^{-/-} ⁶⁷.

Bien qu'ERK3/4 phosphoryle MK5 dans sa boucle d'activation sur le résidu Thr182, ERK3/4 a également été montré pour agir comme une protéine structurelle en favorisant l'auto-phosphorylation et l'activation de MK5 ⁷². ERK3 et ERK4 peuvent également réguler la localisation nucléaire de MK5 ^{61,67,69,72}. Lorsqu'elles sont exprimées de manière indépendante, MK5 et ERK3 localisent principalement dans le noyau, tandis que ERK4 est localisée au cytoplasme. La coexpression de MK5 avec ERK3 ou ERK4 favorise la relocalisation de MK5 vers le cytoplasme, et cet événement est favorisé suite à l'activation de la boucle de phosphorylation de ERK3 et de ERK4 par Pak ⁶³.

L'élimination du gène *Mk5* chez la souris de fond génétique mixte ne donne pas lieu à des changements phénotypiques détectables ⁷⁴. Cependant, l'inactivation de *Mk5*

dans une souris de fond génétique C57BL/6 pur conduit à la létalité à jour embryonnaire 11,5 (E11.5) avec une pénétrance incomplète ⁷². De plus, les ARNm de ERK3 et de MK5 ont été montrés pour être co-exprimés dans l'espace et dans le temps pendant l'embryogenèse de la souris, suggérant un rôle important pour ce module de signalisation pendant le développement ⁷⁷. Toutefois, la fonction biologique exacte de MK5 est inconnue, mais des données récentes suggèrent que MK5 peut jouer un rôle dans la sénescence induite par des oncogènes ⁷⁹ et le remodelage de l'actine ⁸⁰. Au départ, les chercheurs croyaient que MK5 partagerait de nombreux substrats avec MK2, comme Hsp27 et la glycogène synthase ⁷¹. Toutefois, avec la caractérisation de la souris déficiente pour l'expression de MK5, ces interactions n'existent pas ⁷⁴. Malgré la similitude relativement élevée entre MK2/3 et MK5, les souris MK5 déficientes ne présentent aucune des modifications phénotypiques vu dans des animaux déficients pour MK2 ⁸¹.

Certaines études suggèrent qu'ERK3 peut jouer un rôle dans la suppression des tumeurs, y compris son effet négatif sur la progression du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire et la migration ^{58, 206}. Il a été démontré récemment que MK5, une importante protéine effectrice de ERK3, pourrait promouvoir la suppression des tumeurs et la sénescence induite par des oncogènes ⁷⁹. En effet, la souris MK5 déficiente sur un fond génétique mixte est plus sensible à la carcinogenèse de peau induite par le mutagène di-méthylbenzanthracene (DMBA), un agent qui provoque des tumeurs de la peau qui sont 90% positifs pour les mutations de Ras. Conformément à ces résultats, MK5 est essentielle pour permettre à Ras d'induire la sénescence dans les fibroblastes primaires de souris et d'humains. Toutefois, aucune étude ne prouve que cette induction soit ERK3 dépendante.

La réintroduction d'une protéine mutante MK5, dont le domaine kinase de cette dernière n'est plus fonctionnel, ne peut pas restaurer la sénescence induite par Ras dans les cellules déficientes en MK5, ce qui suggère que MK5 peut réguler un substrat essentiel impliqué dans la sénescence cellulaire. Le même groupe a montré que MK5 phosphoryle p53 sur la Ser37, un résidu important qui favorise son activité

biologique ⁷⁹. Bien que le rôle de MK5 dans la sénescence induite par un oncogène semblait exiger l'activation de p38, les rôles potentiels de ERK3 et de ERK4 n'ont pas été déterminés dans cette étude.

Brièvement, ERK3 semble jouer plusieurs rôles importants chez la souris. ERK3 participe à la différenciation et au développement de différents types cellulaires. De plus, ERK3 jouerait un rôle lors du cycle cellulaire pour permettre à la différenciation cellulaire de se produire. Basé sur ces observations, il est possible de construire un modèle bien simple. Tout d'abord, ERK3 s'accumule dans le cytoplasme des cellules en arrêt de prolifération (en G1 du cycle cellulaire). La cellule reçoit alors des signaux de différenciation. ERK3 est ciblé par ubiquitination. Cette protéine est alors dégradée par le protéasome et une prolifération cellulaire survient ⁵.

Finalement, les groupes de Gaestel et de Meloche ont démontré un nouveau rôle pour le complexe ERK3/MK5 dans la régulation de la fonction des septines et de la morphologie des dendrites chez les cellules du cerveau chez la souris ²⁰⁷.

1.1.2.2 ERK7/8

1.1.2.2.1 Identification, structure et localisation

ERK7 a été cloné de la même façon que ERK3 et ERK4 à la fin des années 1990 ⁸². Peu de temps après, une sonde dérivée de la séquence de ERK7 a été construite. Ceci a mené à la découverte de l'orthologue de ERK7, ERK8 chez l'humain ⁸³. ERK7/8 sont homologues à 69 % ⁵. ERK7 est considérée comme membre des MAPK non-conventionnelles, puisque, comme ERK3/4, ERK7 possède une extension C-terminale ^{82,84}. De plus, la partie N-terminale de ERK7 est responsable de sa dégradation par la voie d'ubiquitination/protéasome ⁸⁵.

1.1.2.2 Activation et rôles biologiques

Peu de caractéristiques sont connues sur ERK7/8. À ce jour, il n'existe aucune MAPKK qui active ERK7/8. Toutefois, le motif de la boucle d'activation du domaine kinase de ERK7/8 est une Thr-Glu-Tyr, laissant suggérer que ERK7/8 pourrait être activé via des MAPKK conventionnelles. Dans le cas de ERK7, ces résidus semblent être constitutivement phosphorylés, car aucun signal extracellulaire ne permet son activation. L'évidence actuelle semble pointer vers une autophosphorylation de ERK7^{82,84}. ERK8 semble être capable de s'autophosphoryler *in vitro* et *in vivo*^{83,86}.

À ce jour, aucune étude n'a pu identifier un substrat de ERK7 *in vivo*. Cependant, plusieurs substrats ont pu être identifiés *in vitro*, dont des substrats des MAPK conventionnelles comme MBP, c-Fos et c-Myc⁸². Par contre, ERK8 semble phosphoryler uniquement MBP *in vitro*⁸⁶. Malgré le fait qu'il existe peu de substrats connus pour ERK7/8, ces dernières sont importantes pour la régulation de la prolifération cellulaire, la réponse à l'œstrogène et aux glucocorticoïdes^{82,87,88}.

1.1.2.3 NLK

1.1.2.3.1 Identification, structure et localisation

Nemo-like kinase (NLK) a été découvert en 1994 par PCR par l'utilisation de séquences dégénérées provenant de MAPK conventionnelles⁸⁹. NLK est l'orthologue de nemo, une protéine qui à l'origine fut découverte chez la drosophile. NLK a une homologie de 45% avec le domaine kinase de ERK2. NLK est une MAPK non-conventionnelle, car elle possède des extensions N-terminale et C-terminale. La fonction de l'extension N-terminale reste à ce jour inconnue, mais celle de l'extension C-terminale permettrait une interaction avec ses substrats⁹⁰.

1.1.2.3.2 Activation et rôles biologiques

NLK est activée par la voie Wnt⁹¹. De plus, plusieurs cytokines, dont IL-6, G-CSF et TGF- β , sont capables d'activer NLK^{90,92}. La voie de signalisation de NLK demeure pratiquement inconnu à ce jour, cependant plusieurs groupes ont rapporté que TAK-1 peut également activer NLK^{90,93,94}. Aucune MAPKK régule directement NLK, mais sa boucle d'activation est composée de résidus Thr-Gln-Glu, qui est retrouvée également dans la boucle d'activation de Cdk1⁸⁹.

À ce jour, plusieurs substrats de NLK ont été trouvés, notamment des facteurs de transcription, dont des membres de la famille de T-cell factor/lymphoid-enhancer factor (TCF/LEF) et STAT3^{92,93}. En réponse à son activation par la voie Wnt, NLK peut réguler positivement et négativement la voie β -caténine^{93,94}. De plus, NLK peut également activer le proto-oncogène c-Myb en réponse à la voie Wnt⁹¹. Finalement, aucun MAPKAPK n'est activée par NLK.

En conclusion, les MAPK jouent un rôle très important lors des processus de prolifération, de différenciation et de survie des cellules de tout genre. Dans la prochaine partie de ce mémoire, je vais décrire la thymopoïèse, un processus biologique qui implique plusieurs étapes de prolifération, de différenciation et de survie cellulaire.

1.2 LE DÉVELOPPEMENT THYMIQUE

Les étapes du développement des lymphocytes T dans le thymus sont essentielles à la génération de cellules T capables de défendre l'hôte contre différents pathogènes et cancers. Ces mêmes lymphocytes T peuvent être classés selon la composition de leur récepteur, leur spécificité aux antigènes et leur fonction effectrice. Tout d'abord, les progéniteurs hématopoïétiques entrent dans le thymus et se différencient en thymocytes double négatifs (DN, $CD4^-CD8^-$), afin d'assurer leur expansion. Les thymocytes passent par plusieurs stades de DN (DN1 : $CD25^-CD44^+$; DN2 : $CD25^+CD44^+$; DN3 : $CD25^+CD44^-$; DN4 : $CD25^-CD44^-$). Les thymocytes des deux premiers stades, DN1 et DN2, sont en mode prolifération pour augmenter leur nombre dans le thymus. Ensuite, cette prolifération arrête au stade DN3 pour permettre aux thymocytes de réarranger, grâce aux recombinaisons RAG1 et RAG2, le locus β du récepteur spécifique des cellules T (RCT). Seuls les thymocytes DN3 qui auront effectué un réarrangement fonctionnel de la chaîne β du RCT exprimeront un pré-RCT à leur surface et pourront recevoir les signaux nécessaires à leur survie et à leur différenciation vers l'étape DN4. Après une phase de prolifération massive à l'étape DN4, les thymocytes cesseront à nouveau de proliférer et débuteront une nouvelle étape de différenciation pendant laquelle ils réarrangeront le locus α du RCT et co-exprimeront simultanément les molécules CD4 et CD8 (étape double positive (DP)). Le nouveau RCT exprimé à la surface des thymocytes DP sera alors mis à l'épreuve par l'environnement thymique afin de ne permettre qu'aux thymocytes exprimant un RCT fonctionnel, utile et non-autoréactif (sélection négative et positive) de quitter le thymus pour aller rejoindre la périphérie afin de patrouiller et défendre l'organisme. Dans cette partie du mémoire, je vais décrire plus précisément comment une cellule souche hématopoïétique donne naissance à un lymphocyte T mature et fonctionnel en décrivant la colonisation du thymus, l'engagement des cellules progénitrices vers la lignée T, le choix $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$, la β -sélection, les sélections positive et négative et le choix CD4SP versus CD8SP.

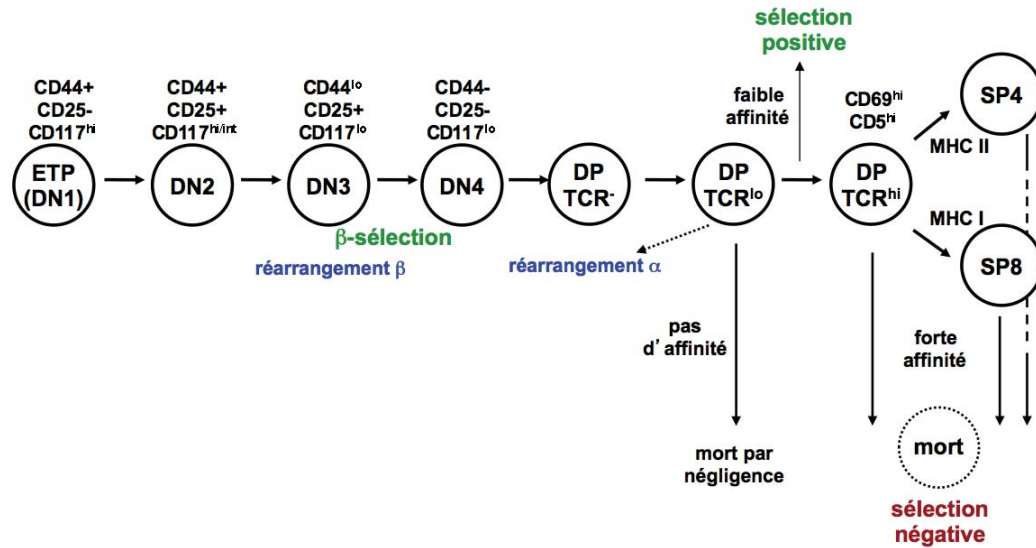


Figure 6. Le développement des lymphocytes T. Des progéniteurs thymiques précoces (ETP), dérivés de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, colonisent le thymus où ils s'engagent vers la lignée des lymphocytes T sous l'influence de la voie de signalisation Notch. Les différentes étapes de la différenciation des cellules T peuvent être suivie en utilisant l'expression des molécules CD4 et CD8. Les thymocytes double-négatifs (DN; CD4⁻CD8⁻) peuvent encore être divisés de DN1 à DN4 en fonction de l'expression cellulaire des molécules CD44, CD25 et CD117 (c-kit) comme illustré. Un réarrangement réussi du locus RCT β permet aux thymocytes d'atteindre le premier point de contrôle de leur développement, la β -sélection. Cette dernière conduit à la survie, la prolifération et la différenciation des thymocytes double positifs (DP; CD4⁺CD8⁺). Les thymocytes DP peuvent être divisés en trois sous-groupes en fonction du niveau d'expression du récepteur de cellule T $\alpha\beta$ à la surface de la cellule. Les thymocytes DP ayant un RCT⁻ sont dans le processus de réarrangement de la chaîne α du RCT. Si le réarrangement est réussi, les thymocytes DP exprimeront des niveaux faibles du RCT et ces thymocytes pourront vérifier la spécificité de leur TCR. Si le RCT des thymocytes DP a une faible affinité pour le complexe CMH-peptide du soi, les thymocytes DP subiront une sélection positive et continueront leur différenciation en thymocyte simple positif (SP) (SP4: CD4⁺CD8⁻ si le thymocytes est restreint aux molécules du CMH de classe II; SP8: CD4⁺CD8⁺, si le thymocytes est restreint aux molécules du CMH de classe I). En conséquence de la sélection positive, les thymocytes DP vont augmenter leur niveau d'expression des molécules RCT, CD69 et CD5. Si les thymocytes DP n'ont pas d'affinité détectable pour le complexe CMH-peptide du soi, ils vont essayer des réarrangements successifs des gènes RCT α . Toutefois, si les thymocytes DP ne parviennent pas à exprimer un RCT restreint par le CMH, les thymocytes DP vont mourir par négligence. Les thymocytes vont ensuite subir une sélection négative, pour éliminer les cellules qui ont une trop forte affinité pour le complexe CMH-peptide du soi. Cette deuxième sélection peut se produire soit au stade de DP ou soit lors de la différenciation des SP. Tiré de ⁹⁵.

1.2.1 La colonisation du thymus

La migration de progéniteurs lymphoïdes (LMPP) provenant du foie foetal ou de la moelle osseuse vers le thymus est la première étape du développement intrathymique des lymphocytes T ¹⁰⁷. Plusieurs mécanismes semblent dicter l'entrée des progéniteurs des lymphocytes T dans le thymus, avant et après sa vascularisation. Cependant, ces mécanismes demeurent toutefois peu connus à ce jour et plusieurs groupes essaient d'en percer le mystère. Au cours des dernières années, des études ont démontré le rôle essentiel de certaines chémokines, dont CCL19, CCL21, CCL25 et CXCL12, et intégrines, dont CD44, ICAM-1 et VCAM-1, dans le processus de migration thymique chez le fœtus ⁹⁶⁻⁹⁸. Chez le thymus adulte, le processus de migration thymique comprend d'autres chémokines et intégrines, dont P-sélectine, CCL25, CCR9 et CCR7 ⁹⁹⁻¹⁰¹.

Plusieurs types de progéniteurs hématopoïétiques sont capables de coloniser le thymus et ont le potentiel de donner naissance à la lignée des lymphocytes T. Le plus commun est appelé progéniteurs lymphoïdes commun (Commun Lymphoid Progenitor ; CLP) ¹⁰². Ces cellules peuvent facilement être caractérisées par les marqueurs Lin (*lineage*), CD25^{kit^{hi}} ¹⁰². Ces cellules proviennent d'une multitude d'endroits extrathymiques (sang, rate, moelle osseuse) ^{103,104}. Des évidences plus récentes montrent que ces progéniteurs deviendront les cellules appelées cellules progéniteurs thymiques précoces (Early Thymic Progenitors ; ETP). Ces cellules ont la principale caractéristique d'être engagées vers la lignée T. Toutefois, elles peuvent toujours se rediriger vers les lignées myéloïdes ^{102,105}.

1.2.2 L'engagement vers la lignée lymphocytaire T

L'aventure des cellules progénitrices, dont les ETP, débute à la jonction cortico-médullaire (figure 7), la partie la plus dense du thymus. La perte de la multipotence des cellules ETP est un processus graduel. Ce processus commence lors des étapes plus précoces du développement T, soit au stade des thymocytes double négatif (DN),

qui sont caractérisés par l'absence des molécules de surface CD4 et CD8. De plus, cette population de thymocytes peut aussi être sous divisée (DN1 à DN4) phénotypiquement par la présence ou non des molécules CD25 et CD44 (DN1, CD44+CD25- ; DN2, CD44+CD24+ ; DN3, CD44-CD25+ ; DN4, CD44-CD25-). L'engagement des progéniteurs vers la lignée T est complété à l'étape DN2 ¹⁰⁶. De plus, un engagement vers la lignée T doit comporter une répression de gènes impliqués dans d'autre engagement vers d'autres lignées, notamment la lignée des lymphocyte B. Depuis longtemps, les immunologistes ont voulu savoir ce qui dictait le choix de l'engagement de la lignée T versus la lignée B. Une classe de molécule, identifié pour la première fois chez la drosophile, les récepteurs Notch et ses ligands a permis d'élucider ce mystère. Le récepteur Notch se retrouve sur les thymocytes et les cellules épithéliales du thymus expriment les ligands de Notch, soit Delta-like 1 et Delta-like 4 ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Cette interaction récepteur/ligand permet alors le clivage de Notch. Notch clivé ou intracellulaire (Notch-IC) peut maintenant se diriger vers le noyau et induire la transcription de gènes important pour le choix de différenciation ¹⁰⁸⁻¹¹⁰. C'est en 1999 que le groupe de Warren S. Pear a pu démontré expérimentalement que c'est la voie Notch qui dicte ce choix en surexprimant Notch1-IC dans les progéniteurs de la moelle osseuse provoquant un développement ectopique des lymphocytes T au dépend des lymphocytes B dans la moelle osseuse ^{111-113, 114, 208}. Dans la même année, le groupe Radtke a utilisé un modèle de souris dont Notch-1 est éliminé de façon conditionnel dans les cellules lymphocytaires pour démontrer un arrêt du développement des lymphocytes T dans le thymus et l'apparition du développement des lymphocytes B dans le thymus ¹¹⁴. De plus, des expériences ont démontré que l'interaction de Notch avec ses ligands, serait impliquée dans le choix des CLP de poursuivre la voie T plutôt que B ¹¹⁵. Grâce à ces découvertes, le groupe de Zuniga-Pflucker a développé un modèle d'étude *in vitro* du développement T par la transfection du ligand de Notch, Delta-like 1, dans une lignée de cellules stromales de la moelle osseuse. Par la suite, des progéniteurs provenant de la moelle osseuse ont été mis en présence avec ces cellules stromales transfectées. Le développement T a pu donc être récapitulé *in vitro* en absence de thymus ¹¹⁶. Récemment, des études ont identifié d'autres facteurs de transcription, tel que Runx1, GATA-3 et des

protéines E-box qui interagissent avec Notch1 pour initier l'engagement vers la lignée T^{106,107}.

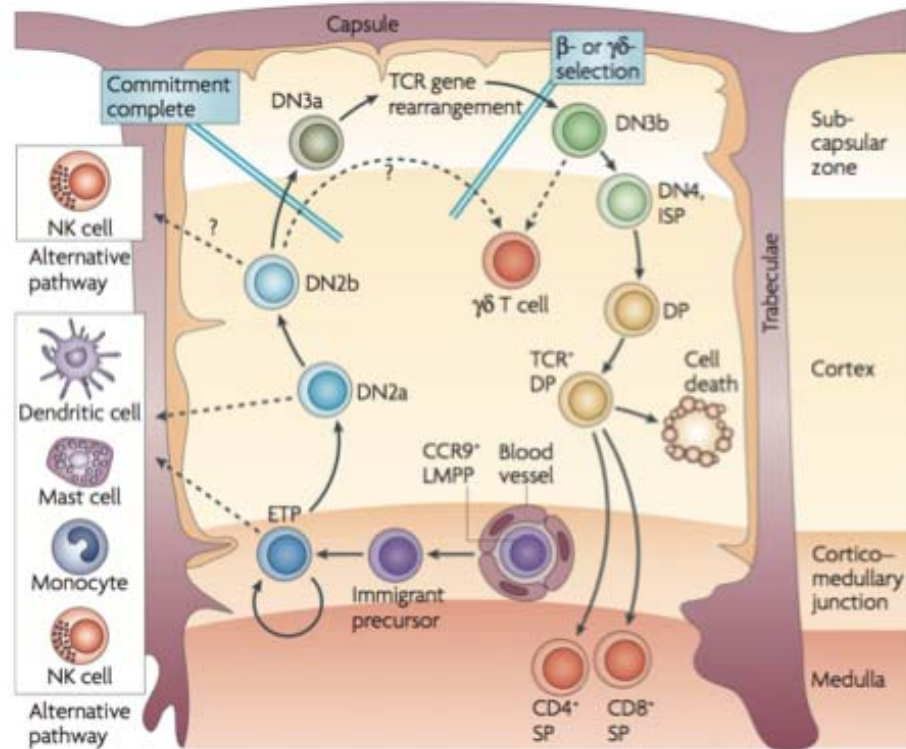


Figure 7. Localisation des thymocytes dans le thymus selon leur stade de développement. Les cellules progénitrices LMPP entre dans le thymus par des vaisseaux sanguins dans la jonction cortico-médullaire. Ces cellules deviendront les ETP. Les thymocytes au stade DN se développent dans le cortex et se dirigent vers la capsule du thymus. Ensuite, les cellules reviennent vers le cortex pour passer au stade de thymocytes DP. Finalement, les cellules se dirigent vers la médulla lorsqu'elles ont passées la sélection positive. Les cellules subissent la sélection négative dans la médulla et le cortex et celles qui ne sont pas éliminées se dirigent la région cortico-médullaire pour sortir du thymus. Tiré de ¹⁰⁷.

1.2.3 Le choix $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$

Il existe deux types de RCT chez les lymphocytes T, le RCT $\alpha\beta$ et le RCT $\gamma\delta$. Au stade DN2 ou DN3, un thymocyte possède la capacité de devenir soit une cellule exprimant un pré-RCT soit une cellule exprimant un RCT $\gamma\delta$. Si le pré-RCT est exprimé à la surface du thymocyte, il poursuit sa différenciation vers le stade double positif (DP). Par contre, si c'est le RCT $\gamma\delta$ qui est exprimé sur le thymocyte, ce

dernier devient alors une cellule $T\gamma\delta$, n'exprimant pas de CD4 ni de CD8. Ce choix est très important puisque c'est à ce moment où les thymocytes T acquiert la fonction adaptative du système immunitaire. Les avantages d'avoir les deux types de RCT sont de permettre à l'organisme de reconnaître d'avantage d'antigène et ces deux types de thymocytes possèdent des fonctions totalement différentes, par exemple les cellules $T\gamma\delta$ ont la capacité d'effectuer des fonctions du système immunitaire inné, dont la phagocytose, la maturation des cellules dendritiques, la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire ¹¹⁷. Les études pour élucider les fonctions des cellules $T\gamma\delta$ ne font que commencer. Quels sont les signaux qui dictent ce choix? Le modèle qui a émergé au cours du temps vient du fait que les molécules du $RCT\gamma\delta$ étaient plus fortement exprimées sur les thymocytes que le pré-RCT, qui est pratiquement indétectable à la surface de la cellule, suggérant que la force du signal dicterait le choix de différenciation $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ ¹¹⁸. De plus, le groupe de Hayes, en 2005, a démontré que le niveau de phosphorylation de ERK1/2 et de ZAP-70 étaient plus élevé chez les DN ayant un $RCT\gamma\delta$ que chez les DN-pré-RCT, suggérant une plus forte activité du $RCT\gamma\delta$ ^{106,118-120}. Dans la même année, le groupe de Haks a atténué la force des ligands reconnus par le $RCT\gamma\delta$. De ce fait, le groupe de Haks a pu observé que les DN- $RCT\gamma\delta$ faisait un mauvais choix de différenciation, car ils s'engageaient vers le stade DP ^{119,121}. Dans ce mémoire, je vais me concentrer sur les thymocytes possédant un $RCT\alpha\beta$. Donc, après un arrêt de prolifération au stade DN3 de leur développement, les cellules déjà engagées vers la lignée T peuvent réarranger la chaîne β de leur RCT. Le réarrangement du locus $RCT\beta$ est coordonné par les enzymes RAG (Recombination activating gene), découvert par le groupe de David Baltimore en 1989 ¹²². Il est primordial que la cellule arrête de proliférer, puisque les enzymes RAG ne sont pas stables dans les cellules en prolifération et que les réarrangements de gènes peuvent provoquer des cellules à devenir cancéreuse à cause des bris de l'ADN. Le processus détaillé de la recombinaison V(D)J est discuté ci-dessous.

1.2.4 La recombinaison V(D)J

Les thymocytes possèdent 4 loci susceptibles d'être recombinaisonés par les enzymes RAG : le locus RCT α , le locus RCT β , le locus RCT γ et le locus RCT δ . Chaque locus contient plusieurs segments permettant ainsi aux thymocytes d'avoir la possibilité de créer un très grand nombre de réarrangement (Figure 8).

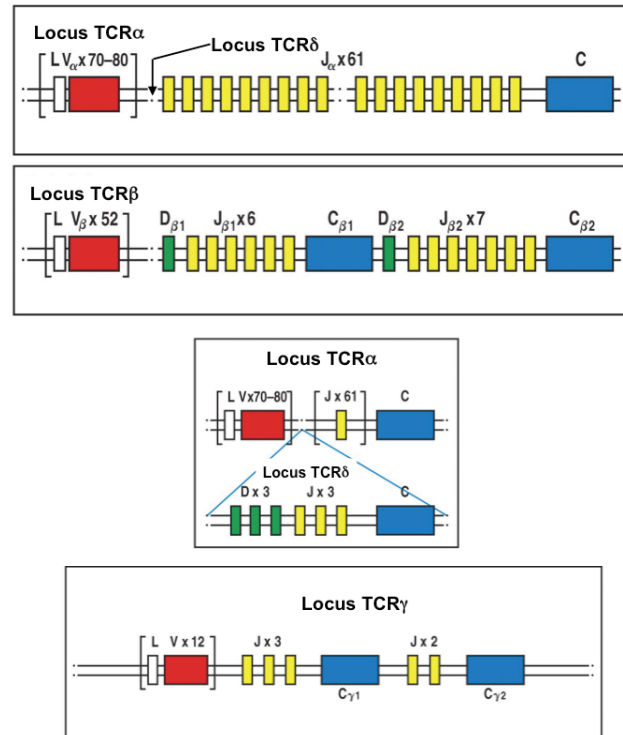


Figure 8. Schéma des loci RCT α , RCT β , RCT γ et RCT δ . Dans chaque locus, les segments rouges sont les régions variables (V), les segments jaunes sont les régions de jonction (J), les segments verts sont les régions de diversité (D) et les segments bleus sont les régions constantes (C).

Ce sont les juxtapositions des différents segments que nous appelons la recombinaison V(D)J. Donc, la formation de la chaîne β du RCT est le résultat de la juxtaposition des différents segments V(D)J. La présence de plusieurs segments de gènes V(D)J permet de créer un grand répertoire de RCT. La recombinaison V(D)J est un processus très bien contrôlé par la cellule. Le contrôle serré de cette recombinaison est essentiel pour éviter les translocations de chromosomes et les cancers de lymphocytes B et T ¹²³. Cette recombinaison commence lorsque les thymocytes au stade DN2-DN3 arrêtent de proliférer. Cet arrêt est primordial,

puisque l'enzyme RAG-2 n'est pas stable dans les cellules qui prolifèrent et sans RAG-2, la recombinaison serait impossible. De plus, cet arrêt est nécessaire pour empêcher la cellule de continuer de se diviser en ayant des bris dans son ADN, ce qui pourrait causer la formation de cellules cancéreuses ^{124,125}. Le processus de recombinaison V(D)J passe par 5 grandes étapes : initiation, synapse, clivage, protection et apprêtement et résolution.

1.2.4.1 L'initiation de la recombinaison

Pour que la recombinaison débute, les deux enzymes RAG-1 et RAG-2 doivent être présentes dans la cellule. En effet, l'activité de RAG-1 est 1 000 fois plus puissante en présence de RAG-2 ¹²⁶. Chez les thymocytes, le rôle précis des enzymes RAG1 et RAG2 est de reconnaître et aligner les séquences des signaux de recombinaison (RSS) (RSS 12 pour la région variable (V) et RSS23 pour la région jonction (J)) pour permettre le clivage du segment de gène. Les RSS sont composés de trois parties distinctes : un heptamère, un espaceur de 12 ou 23 pb et un nanomère. Puisque la région 3' des segments V est toujours suivie du RSS12 et la région 5' des segments J débutent par un RSS23 (Figure 9), les recombinases RAG vont toujours éliminer la région qui est située entre les deux RSS ¹²⁷, puisque la règle d'appariement nécessite que les recombinases RAG soient chacune sur un brin d'ADN différent. Les séquences entourant l'espaceur, nommées heptamère et nanomère, sont extrêmement bien conservées au cours de l'évolution. De son côté, l'espaceur ne l'est pas. Ce n'est pas le type de nucléotide qui est important, mais le nombre. Donc, RAG-1 interagit principalement avec l'espaceur et le nanomère. Le recrutement de RAG-2 stabilise le complexe entre RAG-1 et ADN au niveau de l'heptamère. Par la suite, deux autres protéines viennent stabiliser le tout, les protéines du groupe de haute mobilité (HMG) ¹²⁸. En effet, ces protéines servent de cofacteurs, car elles servent à plier l'ADN. Ensuite, les enzymes RAG vont cliver l'ADN double brin (Figure 9). Cette coupure de l'ADN double brin va mener à l'étape suivante.

1.2.4.2 La synapse de recombinaison

La création de la synapse de recombinaison demeure à ce jour mal comprise. Toutefois, c'est à cette étape où le complexe RAG-1/RAG-2/HMG/RSS12, possédant un RSS12, va se rapprocher d'un complexe RAG-1/RAG-2/HMG/RSS23, possédant un RSS23. C'est la règle d'appariement 12-23¹²⁷. Il est important de mentionner ici que ces régions peuvent être situées très loin l'une de l'autre dans la chaîne d'ADN (Figure 10).

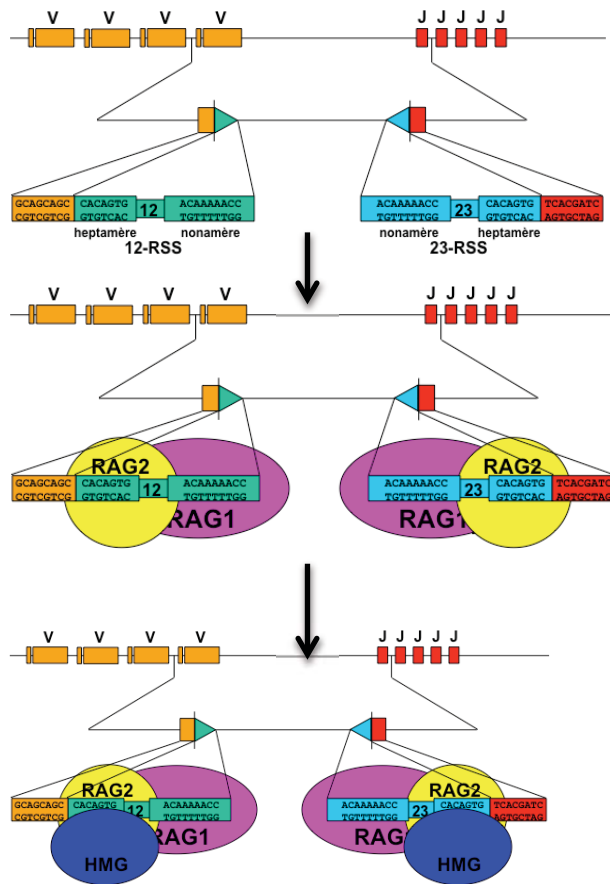


Figure 9. Étapes de l'initiation de la recombinaison. Tout d'abord, l'enzyme RAG1 cible les nanomères à côté des segments V et J. Ensuite, RAG2 vient stabiliser le complexe et active RAG1. Finalement, HMG vient stabiliser le complexe davantage et plie l'ADN.

Le clivage des brins d'ADN se fait à la fin de la région variable et au début de la région jonction par transestérification¹²⁹.

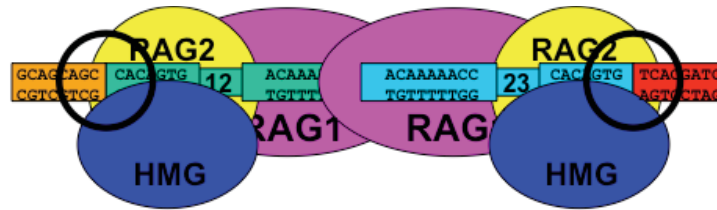


Figure 10. Synapse de la recombinaison. Le complexe RAG-1/RAG-2/HMG/RSS12 se rapproche du complexe RAG-1/RAG-2/HMG/RSS23.

1.2.4.3 Le clivage des segments heptamère/espaceur (12 ou 23) /nanomère

Le clivage se fait par transestérification, comme mentionné précédemment. Par la suite, une structure en épingle à cheveux à chaque extrémité des segments clivés vient se former. En effet, le côté 3' d'un brin d'ADN vient se juxtaposer sur le côté 5' de l'autre brin d'ADN. Donc, les brins d'ADN ne sont pas ouverts pour la séquence codante. Toutefois, le cercle de recombinaison possède encore des extrémités franches. Je vais décrire le cercle de recombinaison un peu plus loin dans cette partie. Cette réaction ne peut se produire qu'en présence d'une torsion significative de l'un ou des deux brins de l'ADN, causée par le complexe RAG-1/RAG-2/HMG¹²⁸ (Figure 11).

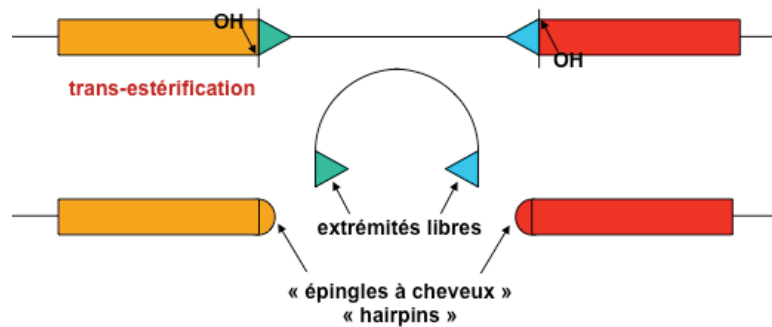


Figure 11. Clivage des segments. Le clivage se fait par transestérification. Par la suite, il y a formation d'une structure en épingle à cheveux. La partie qui va être éliminée va former le joint signal.

1.2.4.4 Protection et apprêtement

La prochaine étape est la protection et l'apprêtement de l'ADN. Premièrement, un complexe de protéines formé de Ku70 et Ku80 est recruté sur l'ADN ¹³⁰⁻¹³². Puisque le phénomène d'épingle à cheveux est considéré comme anormal au sein de la cellule, les brins d'ADN doivent être protégés de la dégradation. Le complexe Ku70/80, qui agit de façon non spécifique sur l'ADN, permet de protéger près de 25 pb d'ADN ²⁰⁹. De plus, le facteur nucléaire Ku, joue le rôle de facteur de ciblage, c'est-à-dire qu'il est essentiel (la délétion chez la souris est létale) pour le recrutement d'autres protéines importantes pour cette étape de la recombinaison V(D)J. La première protéine à être recrutée est le DNA-PKcs (DNA-dépendant protein kinase catalytic subunit ou sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante à l'ADN). Cette très grosse protéine (460 kDa) est l'acteur principal de cette phase, en phosphorylant plusieurs substrats, dont l'ARN polymérase et Ku grâce à sa fonction de sérine-thréonine kinase ¹³⁰. De plus, cette protéine permet l'activation de protéines importantes pour l'apprêtement des brins d'ADN, dont Artemis, des exonucléase et terminal désoxynucléotidyl transférase (TdT). Premièrement, Artemis, un membre de la famille des métallo-β-lactamase, hydrolyse les jonctions codantes. Ceci ouvre le brin d'ADN en épingle à cheveux. Les exonucléases et TdT arrivent et font des modifications aux extrémités des brins d'ADN ouvert. Les ajouts de nucléotides de façon aléatoire causent une plus grande diversité à la jonction V(D)J (Figure 12).

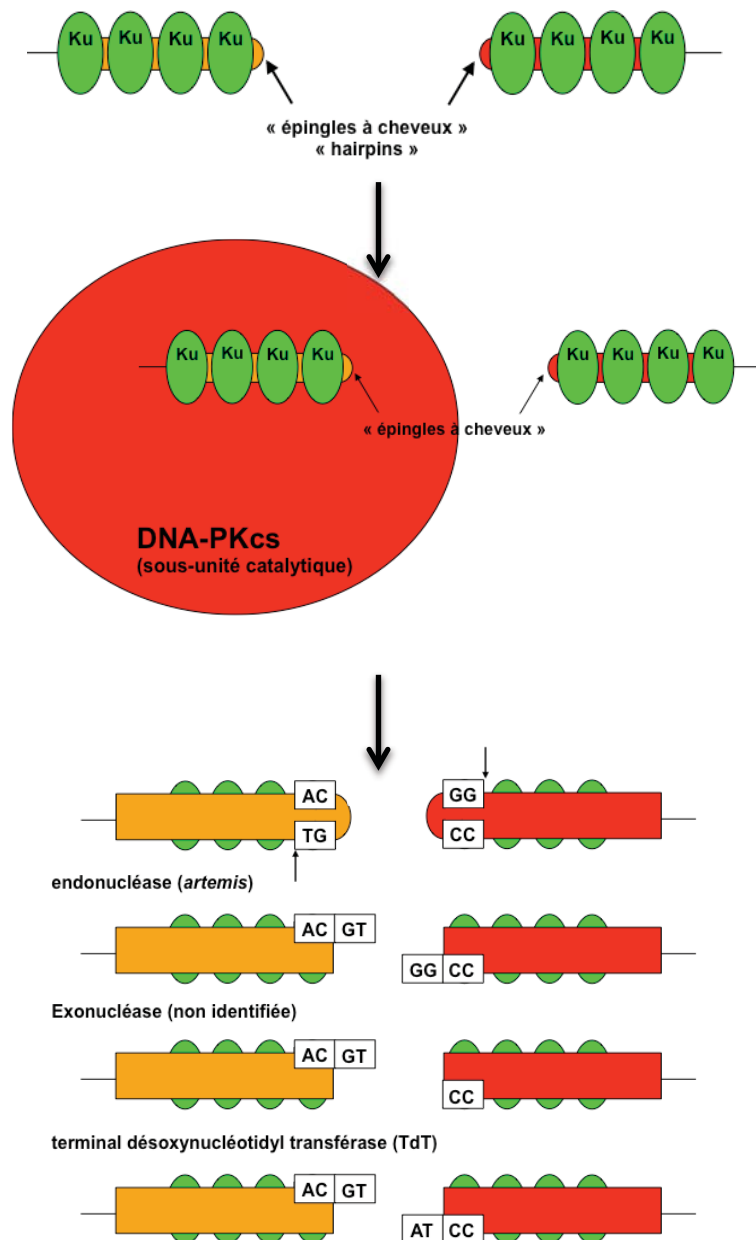


Figure 12. Protection et apprêtement des brins d'ADN. Ku (en vert) vient protéger l'ADN et recrute DNA-PKcs (en rouge). DNA-PKcs active les enzymes Artemis, des exonucléases et TdT. Une nouvelle diversification des segments V(D)J est créée.

1.2.4.5 La résolution de la jonction codant et de la jonction signal

Finalement, des protéines impliquées dans la réparation de bris d'ADN double-brin par la voie NHEJ (non homologous end joining pathway) viennent à leur tour sur l'ADN ¹³⁰. XRCC4 et l'ADN ligase IV sont recrutés par la protéine Ku. *XRCC4* se complexe avec la DNA ligase IV avec une très haute affinité et en augmente son activité. Il est important de mentionner que XRCC4 est nécessaire pour le positionnement de la ligase IV au sein du complexe de réparation d'ADN NHEJ ¹³⁰. En 2006, une nouvelle protéine a été découverte, XLF ou Cernunnos, vient interagir avec le complexe XRCC4/ADN ligase IV. Cernunnos/XLF pourrait contribuer directement à la détection de bris d'ADN double brin lorsque celui-ci est recouvert du complexe Ku70/80 ¹³³. Les joints codants sont finalement liés ensemble et nous avons la formation d'un segment V(D)J (Figure 13). Pour terminer, il reste toujours le joint signal dans la cellule. Contrairement à la résolution du joint codant, la résolution du joint signal nécessite des protéines qui sont capable de percevoir les bris double-brins de l'ADN. NBS1 et γ -H2AX, qui sont des surveillants de l'intégrité génomique, sont recrutés pour permettre la résolution du joint signal ¹³⁰. Ces protéines sont responsables pour la création de l'épisode « T-cell receptor excision circle » ou TREC. La cellule n'a plus à se soucier de cet épisode, puisqu'il n'y plus d'extrémité libre pouvant malencontreusement se lier à l'ADN ¹²⁵.

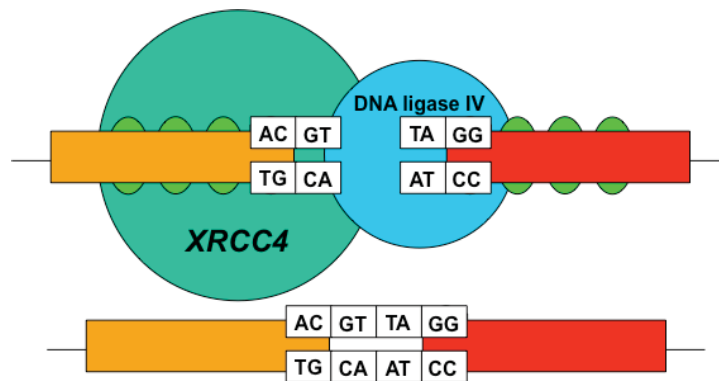


Figure 13. Résolution du joint codant. La protéine Ku recrute XRCC4 (en vert) et DNA ligase IV (en bleu) pour réparer le bris double brin de l'ADN.

1.2.5 La β -sélection chez les thymocytes double négatif

Puisqu'il y a des ajouts et des délétions de nucléotides lors de la recombinaison V(D)J, il y a possibilité que cette recombinaison crée des protéines non-fonctionnelles. La β -sélection est le point de contrôle qui permet de vérifier s'il y a eu une production fonctionnelle de la chaîne β du RCT. Tout d'abord, un pré-T α , qui agit comme un substitut pour la chaîne α finale, vient se lier à la chaîne β du RCT pour former le pré-RCT. Contrairement à la chaîne α finale, le pré-T α est non-réarrangé et par conséquent invariable. Par la suite, le thymocyte reçoit un signal via son pré-RCT, qui est formé par la chaîne RCT β , les chaînes CD3 et le pré-T α , qui s'associe au RCT β en absence du RCT α ^{134,135}. Ensuite, ce complexe est internalisé suite à l'oligomérisation du récepteur à la surface des thymocytes ^{106,136}. À l'intérieur de la cellule, ce complexe permet l'expression du facteur de transcription Erg3, qui induit par la suite l'expression d'Id3. Id3 peut alors réprimer l'expression d'un autre facteur de transcription, ROR γ t. Après une diminution de l'activité de Erg3, le niveau de ROR γ t augmente, causant ainsi un arrêt du cycle cellulaire par l'induction de Cpeb4, le début de réarrangement du RCT α par l'activation de la molécule RAG-2 et la survie cellulaire en augmentant le niveau de Bcl-X_L ^{137,138}. De plus, s'il y a formation d'une chaîne β fonctionnelle, le thymocyte ne fera plus de réarrangement au locus β . Ceci s'appelle l'exclusion allélique ¹³⁸. Au cours des dernières années, d'autres molécules ont été démontrées comme jouant un rôle très important lors de la β -sélection, CXCR4 et Notch1. CXCR4 agit comme costimulateur et il est essentiel pour la survie cellulaire médiée par le pré-RCT pendant la β -sélection ^{139,140}. Notch1 permet la survie des thymocytes ayant un pré-RCT pendant la β -sélection ^{110,141,142}. Les thymocytes qui passent avec succès la β -sélection prolifèrent massivement et initient l'expression des molécules CD4 et CD8. De plus, ces thymocytes se préparent pour un éventuel réarrangement de la chaîne α du RCT. Les thymocytes poursuivent leur différenciation dans la phase double positive (DP).

1.2.6 Les thymocytes double positif

Les thymocytes avec un pré-RCT ayant passé la β -sélection sont les précurseurs des lymphocytes CD4 et CD8 conventionnels. Après avoir formé un RCT β fonctionnel, les thymocytes peuvent alors débiter le réarrangement de la chaîne α du RCT au stade DP du développement des lymphocytes T. De plus, les thymocytes DP peuvent également être classés selon le niveau d'expression de leur RCT à leur surface, soit RCT^{faible(neg)}, soit RCT^{int} ou soit RCT^{fort}. Lorsqu'un thymocyte entre dans le stade DP, le niveau d'expression de son RCT est faible ou négatif (RCT^{faible(neg)}). Ce niveau d'expression augmentera (RCT^{int}) suite à la substitution de la chaîne invariante pré-T α par une chaîne α du RCT. Le réarrangement de la chaîne α du RCT se fait exactement de la même façon que celui de la chaîne β , c'est-à-dire par la recombinaison V(D)J, à quelques différences près. Le locus du RCT α ne possède pas de segment diversité (Figure 8). C'est alors que les thymocytes DP RCT^{int} vont devoir subir un premier événement de sélection, la sélection positive, à cause de la nature aléatoire des réarrangements des chaîne α et β du RCT. La sélection positive permet la sélection de RCT ayant une faible affinité pour des peptides du soi présentés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les molécules du CMH sont responsables de présenter des antigènes provenant de divers environnements, soit du soi ou soit de l'extérieur de l'organisme (d'origine virale ou bactérienne par exemple). Suite à la sélection positive, les niveaux de CD8 commencent à diminuer, donnant ainsi une nouvelle sous population de thymocytes, les thymocytes en transition vers le stade CD4 ou CD8 simple positif (TDS). C'est à cette étape que les thymocytes auront le choix de devenir soit un thymocyte CD4 simple positif, s'ils rencontrent un antigène du soi associé au CMH de classe II ou un thymocyte CD8 simple positif, s'ils voient un antigène du soi associé au CMH de classe I. Par la suite, les thymocytes qui réagissent trop fortement avec un complexe CMH/peptide du soi sont éliminés via la sélection négative.

La régulation de la survie des thymocytes DP est une étape cruciale qui permet à la

cellule d'effectuer des réarrangements multiples de la chaîne α de leur RCT, grâce à la grande diversité que possède le locus RCT α . En effet, le locus RCT α possède de 70 à 80 régions variables (V) et 61 régions jonctionnelles (J), beaucoup plus que le locus RCT β (Figure 8). De plus, contrairement au locus α du RCT, le locus β du RCT possède deux régions diversité (D) et deux régions constantes (C). Par conséquent, la chaîne β peut seulement faire 4 tentatives de réarrangement pour la création d'un RCT β productif. Ces 4 tentatives sont dues à cause du placement de la région D dans le locus β (figure 8). Le RCT α peut donc faire des réarrangements multiples, car il ne possède pas de régions D. De plus, le nombre élevé de régions V-J dans le locus RCT α permet les réarrangements multiples de cette chaîne, car si une chaîne α du RCT est non fonctionnelle (après la sélection positive par exemple), le thymocyte peut alors remanier son RCT α et recommencer de le tester jusqu'à ce qu'il soit fonctionnel ou qu'il y a plus de possibilité de réarrangement disponible. Au cours des dernières années, plusieurs molécules, dont ROR γ t, c-Myb, TCF-1 et PARP-2, ont été étudiées afin de démontrer leur rôle dans le prolongement de la vie des thymocytes DP ¹⁴³⁻¹⁴⁵. ROR γ t et TCF-1 sont responsable de l'activation de la molécule anti-apoptotique, Bcl-X_L ¹⁴³. Bcl-X_L est uniquement exprimée chez les thymocytes DP et sans son activité, ces derniers meurent par négligence, car ils n'auront pas eu l'occasion d'assembler un RCT fonctionnel ^{143,145,146}. De son côté, PARP-2 joue deux rôles spécifiques et essentiels. Le premier est la surveillance du maintien de l'intégrité génomique ^{147,148}. Le deuxième est la survie des thymocytes DP. En effet, il a été observé que les thymocytes *Parp-2*^{-/-} ont une expression réduite de leur RCT, ainsi qu'un répertoire RCT α anormal, suggérant que PARP-2 participerait à la survie de la cellule pendant les multiples réarrangements du RCT α précédant la sélection positive grâce au maintien de l'intégrité génomique ¹⁴⁴.

Dans cette partie du mémoire, je vais d'abord décrire brièvement la voie de signalisation du RCT. Par la suite, je vais présenter la sélection positive qui permet de sauver les thymocytes DP de la mort programmée résultant de l'interaction de leur RCT avec un complexe CMH/peptide du soi exprimé par l'épithélium thymique (ou

avec d'autres molécules du CMH ou CMH-like) et la sélection négative, qui est l'élimination des cellules autoréactives.

1.2.6.1 La voie de signalisation du RCT

Le RCT est composé de 2 chaînes spécifiques aux antigènes, α et β . Un complexe est alors formé avec différentes molécules de CD3, le CD3 γ , le CD3 δ , le CD3 ϵ et le CD3 ζ ¹⁴⁹. Chaque chaîne du CD3 a au moins une copie d'un motif de signalisation, appelé ITAM (ou Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), situé dans leur domaine cytoplasmique. Une variété de molécules membres de la famille Src, tels que Lck et Fyn, phosphoryle ces ITAMs chez les thymocytes^{150, 210}. De plus, il existe d'autres molécules impliquées dans la signalisation du RCT, le CD45, dont le domaine cytoplasmique contient une tyrosine phosphatase, et les corécepteurs CD4 et CD8, dépendamment de la restriction au CMH. Ces corécepteurs possèdent également un domaine cytoplasmique associé à la tyrosine kinase Lck. Lorsque le complexe peptide/CMH se lie au RCT, de nombreux événements surviennent à l'intérieur de la cellule. Tout d'abord, le CD45 enlève des groupements phosphate inhibiteur sur Fyn ou Lck, grâce à l'activité enzymatique de son domaine cytoplasmique, ce qui active Fyn et Lck^{150-152, 211}. Ce dernier phosphoryle ensuite les domaines ITAMs des chaînes CD3. Ensuite, il y a recrutement de la molécule ZAP-70 sur la chaîne CD3 ζ phosphorylée. Le corécepteur peut également se lier au complexe peptide/CMH. Ce rapprochement permet alors à Lck de former un complexe avec ZAP-70 et par conséquent la phosphorylation de Lck survient lorsque la molécule Csk devient inactivé par l'activation cellulaire, soit par trans-autophosphorylation de Lck²¹². Pour continuer, Lck phosphorylé active ZAP-70, qui peut ensuite phosphoryler une panoplie de protéines adaptatrices, dont LAT. La phosphorylation de LAT permet alors une propagation du signal de départ vers plusieurs voies de signalisation intracellulaires, dont la voie NF- κ B, la voie NFAT et les voies ERK1/2, p38 et JNK, activées par la protéine G Ras^{153, 154}. Donc, une activation via le RCT permet de promouvoir de nombreuses cascades de signalisation

aboutissant ultimement à la production de cytokines, la survie cellulaire, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire.

1.2.6.2 La sélection positive

La nature aléatoire du réarrangement de la chaîne α et β du RCT produit des RCT qui ne sont pas toujours utiles pour le thymocyte et par conséquent, il existe un processus de sélection qui permet un tri parmi les thymocytes DP RCT^{int} afin de permettre seulement à ceux qui sont compétents et restreints aux CMH du soi de survivre et continuer leur développement ¹⁵⁵. Ce processus est la sélection positive. Les thymocytes incapables de former une association RCT/complexe peptide du soi/CMH mourront par négligence. Si le thymocyte DP a produit un RCT compétent, restreint au CMH du soi et de faible affinité, le niveau d'expression du RCT devient élevé et le thymocyte DP poursuivra son développement. Toutefois, seulement une infime partie des thymocytes DP passent la sélection positive. Puisque le locus du RCT α possède plusieurs régions variables et jonctionnelles, les thymocytes DP ont la possibilité de recommencer le réarrangement de la chaîne α de leur RCT, car le locus nécessite une organisation adéquate ¹⁵⁵. Les réarrangements multiples de la chaîne α du RCT se font de façon très ordonnée. Lors des réarrangements de la chaîne α du RCT, les segments de la région variable et de la région jonctionnelle sont choisis selon la distance où ils se trouvent, c'est-à-dire que les premiers segments à être choisis sont ceux qui sont les plus proximaux et au fur et à mesure que le thymocyte DP fait des réarrangements multiples, les régions choisies seront plus distales. Une étude faite au début des années '90 a démontré que, non seulement les réarrangements multiples se produisent, mais que le réarrangement du RCT α se poursuit même après l'expression d'un RCT α/β à la surface du thymocyte jusqu'à ce que le processus de recombinaison est arrêté par la sélection positive, ou la mort cellulaire. Les réarrangements séquentiels des gènes du RCT α facilitent la production accrue de thymocytes utiles, en augmentant la fréquence de production de réarrangements dans le cadre de lecture et de RCT α/β qui sont sélectionnés positivement ²²⁹. Après l'épuisement des

possibilités de réarrangement de la chaîne α du RCT, les thymocytes DP meurent à l'intérieur de quelques jours^{156,157}.

Au cours du temps, des marqueurs moléculaires ont pu être identifiés permettant ainsi d'identifier les différents stades de sélection que les thymocytes DP subissent. Les molécules extracellulaires sont le CD69, le CD5, le CD24 (antigène stable à la chaleur) (Heat Stable Antigen ; HSA)) et le « peanut agglutinin » (PNA). Les thymocytes augmentent l'expression des molécules CD69 et CD5 et diminuent l'expression des molécules CD24 et PNA après la sélection positive. En combinant les molécules RCT, CD5 et CD69, nous obtenons des sous-populations de thymocytes DP qui diffèrent selon leur étape de sélection. Dans le cas du CD69, les thymocytes DP pré-sélection sont RCT^{faible} et CD69^{faible} et les thymocytes post-sélection sont RCT^{fort} et CD69^{fort}. Pour le CD5, les thymocytes DP pré-sélection sont RCT^{faible} et CD5^{faible}. Par la suite, l'expression du RCT devient intermédiaire et le CD5 devient fort. Finalement, l'expression du RCT devient élevée et les niveaux de CD5 diminuent pour donner CD5^{int}. Les détails sur le CD5 seront discutés ci-dessous.

La protéine ZAP-70 joue un rôle important dans la sélection thymique. Elle est responsable de bien transmettre le signal perçu par le RCT pour provoquer une cascade de signalisation intracellulaire. De plus, ZAP-70 permet l'échange d'ions de calcium entre la cellule et son environnement après un signal perçu par le RCT. Ensuite, une protéine ZAP-70 absente ou défectueuse chez les thymocytes de souris provoque un défaut de l'activation de la voie ERK1/2¹⁷⁹. Fait intéressant, l'ablation génétique de ZAP-70 chez la souris conduit à un arrêt de la différenciation des thymocytes DP à la transition DP-SP^{158,159}, tandis que chez l'homme, des mutations dans ZAP-70 permettent une sélection positive des thymocytes CD4SP, mais pas des thymocytes CD8SP^{160,161}. Ceci suggère que les thymocytes CD8SP sont peut-être plus dépendant de l'activité de ZAP-70 que les lymphocytes CD4SP. Le groupe de Seddon a mis au point un système très élégant, dans lequel l'expression de ZAP-70 dans les thymocytes peut être manipulée dans le temps. Ils montrent clairement que des niveaux élevés de l'expression de ZAP-70 sont nécessaires pour la sélection

positive efficace des lymphocytes CD8SP que pour la sélection des thymocytes CD4SP ¹⁶². Grâce aux marqueurs RCT et CD5, les auteurs ont pu identifier trois sous populations distinctes de DP : DP1 (RCT^{faible}-CD5^{faible}), DP2 (RCT^{int}CD5^{fort}) et DP3 (RCT^{fort}CD5^{int}). L'injection intrathymique de ces sous-populations a montré que les DP1 et DP2 peuvent donner naissance aux thymocytes CD4SP et CD8SP, tandis que les DP3 ne génère que des thymocytes CD8SP. Fait intéressant, le niveau d'expression de ZAP-70 augmente progressivement de DP1 à DP3. Par ailleurs, dans leur modèle transgénique pour l'expression de ZAP-70, les DP3 sont incapables d'augmenter l'expression de ZAP-70, et en conséquence, les thymocytes CD8SP ne sont pas sélectionnés de façon positive. Les auteurs ont proposé que cette augmentation de ZAP-70 par les DP3 est nécessaire pour permettre la transition des thymocytes DP en thymocytes CD8SP. Toutefois, il n'est pas clair si cela est un défaut de sélection positive ou de la poursuite du développement thymique suite à la sélection positive. Par ailleurs, cette augmentation progressive de l'expression de ZAP-70 dans les thymocytes DP peut aussi avoir une fonction très importante pour permettre la sélection des thymocytes CD4SP et CD8SP dans une fenêtre temporelle séparée et à différents seuils de signalisation afin de faciliter l'engagement vers la lignée CD4SP ou CD8SP ^{95,162}.

Beaucoup d'efforts ont été consacrés à la caractérisation des peptides du soi liés au CMH qui favorisent la sélection positive et à la comparaison de leur avidité pour leur RCT à celle des antigènes apparentés (c'est-à-dire des complexes CMH-peptides liés à l'activation de cellules T matures). Ces analyses, qui ne seront pas abordées ici, ont conduit à l'idée que, pour un RCT donné, les ligands de la sélection positive sont de plus faibles affinités/avidités que les ligands antigéniques apparentés ¹⁵⁵. Néanmoins, l'avidité du RCT pour les peptides du soi liés au CMH, incluant la sélection positive des thymocytes, risque de faire développer des réactions auto-immunes. Ainsi, des mécanismes ont évolué afin de prévenir le développement des cellules T avec une réactivité trop forte aux peptides du soi liés au CMH, ou de réorienter ces cellules vers la suppression de l'immunité ⁹⁵.

Les changements d'expression génique induite lors de la sélection positive par la signalisation du RCT des thymocytes DP ressemblent étrangement à ceux induits par la stimulation des cellules T matures avec un antigène, bien qu'elles ne conduisent pas à la prolifération et à la différenciation en lymphocytes T effecteurs ¹⁶³. Ainsi, la question se pose de savoir pourquoi le complexe CMH/peptide du soi favorise la sélection positive dans le thymus et ne provoque pas une initiation similaire de l'expression des gènes dans les cellules T matures en périphérie. Une possibilité est que l'ensemble des peptides présentés par les cellules épithéliales thymiques diffère de celle présentée par cellules présentatrices d'antigène (CPA). Il est prouvé que cela est le cas, et cela peut contribuer à la réactivité distincte des thymocytes ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Toutefois, les thymocytes DP sont intrinsèquement plus sensibles que les lymphocytes T matures à faible avidité pour le complexe CMH/peptide ^{155,167}.

Bien que la définition même de la sélection positive soit la survie de la mort cellulaire, il n'est pas bien compris comment les signaux du RCT empêchent l'apoptose des thymocytes. La signalisation du RCT augmente l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (Bcl-X_L dans le cas des thymocytes DP), mais Bcl-2 ou Bcl-X_L ne sont pas essentielles pour le développement des lymphocytes T, vraisemblablement en raison de la redondance fonctionnelle avec d'autres membres de la famille Bcl-2, y compris MCL-1 ^{168,169}.

1.2.6.3 La sélection négative

Les thymocytes DP qui seront positivement sélectionnés vont devoir passer une seconde étape de sélection. De plus, la sélection négative peut être faite simultanément avec la sélection positive ¹⁷⁰. La sélection négative teste le thymocyte afin de s'assurer que ce dernier possède un RCT qui ne réagit pas trop fortement avec le complexe peptide du soi/CMH. Si le signal via le RCT est trop fort, le thymocyte est éliminé par apoptose. Cette sélection est très importante pour éliminer les cellules auto-réactives, car un défaut de cette sélection cause de l'auto-immunité en périphérie ^{171,172}. L'élimination des thymocytes trop réactifs se fait par 3 mécanismes distincts :

la délétion clonale, l'anergie et la substitution du récepteur¹⁷¹⁻¹⁷³. Cependant, c'est la délétion clonale qui prime sur les autres¹⁷¹. Au stade DP, la sélection négative des thymocytes débute à la jonction corticomédullaire dans le thymus. Cependant, pour avoir un plus grand répertoire d'antigène à tester, une grande majorité de la sélection négative se produit dans la médulla au stade SP⁹⁵. En effet, les cellules dendritiques (DC), qui sont à la jonction corticomédullaire du thymus et les cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC) sont parmi les meilleures pour présenter des antigènes aux thymocytes dans le contexte de sélection négative. De plus, les mTEC expriment la molécule AIRE, qui est très importante pour réguler l'expression ectopique des antigènes tissus spécifiques (TSA)^{106,172}. Faire de la sélection négative dans la médulla permet aux principales CPA de cette région, les mTEC, d'obtenir des antigènes qui sont tissus spécifiques (par exemple l'insuline des îlots β du pancréas). Ces CPA présenteront des TSA aux thymocytes DP ou SP.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la sélection négative demeurent peu connus. Toutefois, plusieurs molécules ont émergés comme jouant des rôles critiques lors de la sélection négative. De plus, la sélection négative permet l'activation des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose pour pouvoir causer la mort cellulaire des thymocytes auto-réactives. La voie intrinsèque, qui est contrôlée par les membres de la famille de Bcl-2 et la voie extrinsèque, qui est contrôlée par la signalisation des récepteurs de mort. Cependant, elles aboutissent toutes vers une mort cellulaire programmée. La molécule Bim, une molécule pro-apoptotique membre de la famille de Bcl-2, est une molécule importante lors de la sélection négative^{95,172}. En effet, une souris Bim déficiente présente un défaut de la sélection négative. De plus, Bim requiert d'autres molécules pour pouvoir faire sa fonction pro-apoptotique. Ces molécules sont Bax et Bak¹⁷⁴. Récemment, l'abolition d'une kinase spécifique, Mink, résulte en un défaut de délétion clonale des thymocytes auto-réactifs et par conséquent, la sélection négative¹⁷⁵. Finalement, une autre molécule activée après une stimulation du RCT est Nur77^{95,172,176}. Récemment, le groupe de Benoist/Mathis a démontré également un défaut de délétion clonale chez les souris Nur77^{-/-}. En effet, ce groupe a démontré que Nur77 est nécessaire pour l'induction de Bim²¹³.

Cependant, une délétion de Nur77 chez la souris ne démontre aucun défaut prononcé de la sélection négative. Toutefois, un membre de la famille de Nur77, Nor-1 pourrait jouer un rôle redondant dans la sélection négative¹⁷⁷.

1.2.6.4 Les signaux distinguant la sélection positive de la sélection négative

Les signaux reçus lors de la sélection positive et négative doivent être différents, sinon tous les thymocytes mourront avant qu'ils ne puissent quitter le thymus. De nos jours, il existe deux hypothèses permettant de distinguer les signaux de la sélection positive de la sélection négative. L'hypothèse de l'avidité différentielle propose qu'un complexe peptide-CMH offre les signaux de la sélection positive et de la sélection négative, mais que l'avidité de la sélection positive est plus faible (moins de signal est nécessaire pour sauver les thymocytes de la mort), tandis que l'avidité du signal de sélection négative est plus élevée (plus de signal est nécessaire pour éliminer les thymocytes). Les expériences qui appuient cette hypothèse ont été réalisées par le groupe de Tonegawa. Ce groupe a démontré expérimentalement, pour la première fois, grâce à des cultures d'organe thymique (FTOC) de souris RCT transgénique TAP-déficiente, que l'avidité de signalisation contrôle le choix entre la sélection positive et négative en manipulant la quantité de peptides présentés à la surface de la cellule. En utilisant une souris TAP-déficiente, le groupe de Tonegawa a pu modifier le nombre de peptide présenté par les molécules de CMH de classe I. Le gène *Tap7* encode pour une pompe à peptide qui dépend de l'ATP. Cette pompe permet de transférer des peptides du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique de la cellule. Ensuite, les peptides s'associent avec la chaîne lourde du CMH de classe I et la β 2-microglobuline pour former un CMH de classe I stable. Ce dernier est alors transporté à la surface cellulaire. Chez la souris déficiente pour la molécule TAP, le chargement de peptide fait pour une molécule du CMH de classe I est arrêté. Par conséquent, l'expression des molécules du CMH de classe I est grandement réduite à la surface de la cellule et la sélection positive est affectée. Uniquement quelques molécules du CMH de classe I « absent de peptide » seront à la surface de la cellule. Le groupe de Tonegawa a profité de ce modèle expérimental pour faire varier le nombre de

peptides pour la présentation antigénique. En effet, en ajoutant une quantité « X » de peptides avec de la b2-microglobuline dans des cultures de FTOC, les lymphocytes T CD8⁺ sont sélectionnés de façon positive. Le groupe de Tonegawa a poussé l'expérience en utilisant une quantité « 10X » de peptides. En augmentant le nombre de peptide, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ produit était plus bas en comparaison avec la quantité « X ». Cette réduction du nombre de lymphocytes T CD8⁺ est causée par la sélection négative²¹⁴. Le modèle de la signalisation différentielle propose, pour la sélection positive, qu'un ligand de faible affinité stimule le RCT, ce qui active partiellement LAT. La molécule RasGRP serait alors activé par la production de diacylglycérol (DAG). RasGRP stimule une faible activation soutenue de ERK. Pour la sélection négative, le contraire se produit. Un ligand de forte affinité pour le RCT, avec l'aide de molécules de costimulation, phosphoryle entièrement LAT. Ceci cause un recrutement de la molécule Grb2/SOS1 et provoque une forte activation temporaire de ERK. Les molécules p38 et JNK sont également activées. Le groupe de Perlmutter a utilisé une autre approche pour discriminer les signaux de la sélection positive de la sélection négative. Le groupe a comparé ces signaux en utilisant des peptides antagonistes légèrement différents des peptides agonistes, qui offrent des signaux partiels perçus par la cellule. L'activation des lymphocytes T est altérée en fonction de la qualité du signal perçu par cette cellule. Dans ce modèle, les peptides antagonistes peuvent délivrer des signaux conduisant à la sélection positive, mais seulement les peptides agonistes pouvaient fournir des signaux suffisamment forts pour provoquer une sélection négative²¹⁵.

Les molécules RasGRP, Grb2-SOS, LAT, CD45, ZAP-70 et Themis, situées dans la voie de signalisation du RCT, sont d'autres molécules importantes de la sélection positive^{106,151,155,178-180}. La majorité des ces protéines joue un rôle majeur dans l'induction du signal du RCT, en modulant la sensibilité du RCT via de nombreux ligands. La discrimination entre les différentes forces du signal du RCT est essentielle pour permettre la survie des thymocytes. Les différents niveaux de phosphorylation de LAT semble être très important pour permettre la propagation du signal perçu par le RCT¹⁸¹. En effet, LAT possèdent plusieurs sites de phosphorylation, plus le signal

est fort, plus LAT est phosphorylé ¹⁸¹. L'activité de LAT est en quelque sorte contrôlée par l'activité de RasGRP et de Grb2-SOS. En effet, les ligands de forte affinité imitant la sélection négative qui entrent en contact avec le RCT peuvent totalement phosphoryler LAT et l'interaction stable entre Grb2-SOS et LAT ne survient que lorsque LAT est entièrement phosphorylé ^{182,183}. En revanche, les ligands de faible affinité qui entrent en contact avec le RCT conduisent à une phosphorylation partielle de LAT et est suffisante pour activer PLC γ 1 et DAG nécessaire pour la sélection positive ⁹⁵. Par conséquent, l'adaptateur LAT est un acteur central dans le choix que prend une cellule entre la sélection positive et la sélection négative. Le recrutement de la protéine ZAP-70 et les différents degrés de phosphorylation de LAT permettent alors à la cellule de discriminer le signal de la sélection positive de la sélection négative. Dans le cas de la sélection positive, le résultat final de l'association CMH/peptide du soi/RCT permet une activation soutenue et lente des MAPK ERK1/2, provoquant ainsi la survie cellulaire. C'est tout le contraire qui se produit lors de la sélection négative. En effet, l'association CMH/peptide du soi/RCT permet une activation forte et rapide des MAPK ERK1/2, provoquant ainsi la mort cellulaire ⁹⁵.

1.2.7 Le choix CD4SP ou CD8SP

Suite à la sélection positive et négative, les thymocytes doivent faire un choix final avant de pouvoir sortir du thymus. Ce choix dicte si les thymocytes DP vont devenir soit un CD4SP ou un CD8SP. À l'origine, les scientifiques ont pensé que ce choix était plutôt facile, c'est-à-dire qu'il y avait des interactions différentes entre un RCT d'un thymocyte DP qui interagirait avec un peptide lié CMH-I et un RCT d'un thymocyte DP qui interagirait avec un peptide lié CMH-II. Cependant, ceci n'est pas le cas. Au cours du temps, plusieurs modèles ont émergé afin de comprendre comment ce choix est fait. Dans cette partie du mémoire, je vais décrire les modèles classiques, soit le modèle stochastique/sélectif, le modèle instructif de la force du signal, le modèle de durée du signal et pour ensuite terminer avec le nouveau modèle en cours, le modèle cinétique de la signalisation ^{106,184}.

Le modèle stochastique/sélectif indique que le choix CD4SP ou CD8SP se fait de façon aléatoire, indépendamment de la spécificité de leur RCT. Après avoir reçu un signal de la sélection positive via son RCT, le thymocyte choisi d'exprimer le CD4 ou le CD8. Dans le cas où la cellule fait un mauvais choix de corécepteur, la cellule mourra par apoptose, puisque aucun signal de survie ne sera perçu, qui dépendent de la coordination du bon corécepteur avec la spécificité de son RCT ¹⁰⁶.

Le modèle de l'instruction indique que le choix d'engagement vers une lignée s'effectue selon l'identité du CMH (CMH de classe I ou de classe II) impliqué pendant la sélection positive. Ceci aura comme effet d'arrêter la transcription du corécepteur qui n'a pas servi à la sélection positive. Donc, ce modèle propose que l'engagement vers la lignée CD8SP dépend de signaux qualitatifs distincts qui ne peuvent être induits que par un CMHI et que l'engagement vers la lignée CD4SP ne peut être induits que par des signaux du CMHI ²¹⁶. Une version améliorée de ce modèle existe qui tient en compte la durée du signal du RCT. En effet, cette version améliorée a été proposée après que des observations sur les thymocytes DP ont été faites sur les différences de signalisation lors de l'engagement du RCT et du corécepteur ^{184,185}. Brièvement, puisque plus de tyrosine kinase Lck vont se lier sur le domaine intracellulaire de CD4 que celui du CD8, le signal perçu par le complexe CD4/RCT serait plus intense que le complexe CD8/RCT.

De nos jours, le modèle qui explique le mieux le choix CD4SP ou CD8SP est le modèle cinétique de la signalisation (Figure 14) ^{106,184}. Les observations faites *in vitro* et *in vivo* ont indiqué que les thymocytes DP qui reçoivent un signal via leur RCT termine l'expression du CD8, mais pas la transcription CD4 lors de la sélection positive, indépendamment de la restriction au CMH du RCT ¹⁸⁶. Et surtout, malgré l'arrêt de la transcription du gène *Cd8*, les thymocytes DP qui reçoivent un signal via leur RCT pouvaient encore se différencier soit en thymocyte CD4SP ou soit en thymocyte CD8SP ^{184,185}. Basé sur ces observations, le modèle de signalisation cinétique propose que les thymocytes DP qui reçoivent un signal via leur RCT doivent d'abord mettre fin à la transcription du gène *Cd8* et ensuite évaluer l'effet de

cette absence^{184,185}. Si les signaux de sélection positive médiés par le RCT persistent en l'absence de la transcription du CD8, les thymocytes DP se différencieront en thymocytes CD4SP, car le thymocyte est sélectionné positivement malgré le fait qu'il n'exprime plus le CD8. Cependant, si les signaux de sélection positive médiés par le RCT cesse en l'absence de la transcription du CD8, les thymocytes DP se différencieront en thymocytes CD8SP¹⁸⁶.

Dans le modèle cinétique de signalisation, avant que le thymocytes DP se différencie en thymocyte CD4SP ou CD8SP, le thymocyte DP diminue l'expression du CD8 après la sélection positive. Dans ce mémoire, ils seront identifiés comme des thymocytes qui sont en transition entre les DP et les SP, ou thymocytes TDS. Ces thymocytes ont la particularité de donner soit la population CD4SP ou CD8SP. Des études portant sur des souris possédant un RCT transgénique restreint au CMHI ou au CMHII ont démontré que même si une souris avec un RCT spécifique pour un peptide lié au CMH de classe II, la population de thymocytes TDS est toujours présente. Toutefois, ce modèle n'explique pas comment les CD8SP sont produits. C'est alors en 2000 que l'équipe de Singer propose le renversement du corécepteur¹⁸⁶. En effet, c'est grâce à l'interleukine -7 (IL-7) que ce renversement est possible. L'IL-7 permet au thymocytes TDS d'arrêter la transcription du gène *Cd4* et de ré-initier le gène *Cd8*.

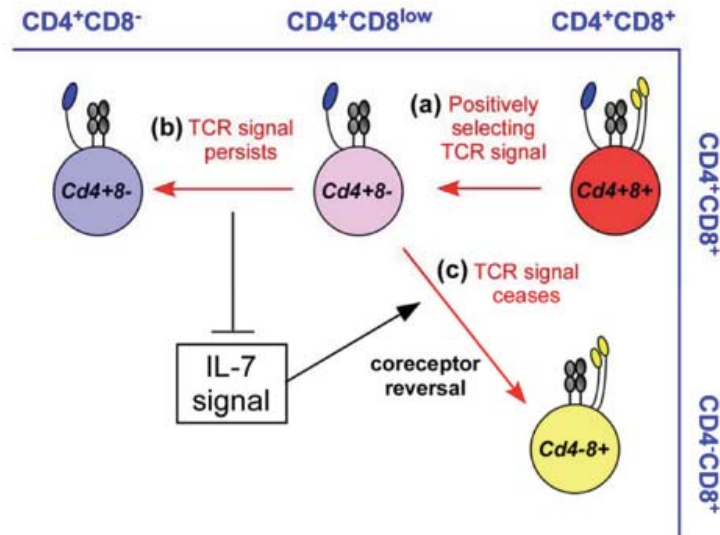


Figure 14. Modèle cinétique de la signalisation lors du choix CD4SP-CD8SP. Quelle que soit la spécificité de leur récepteur des cellules T (RCT), les thymocytes double-positifs (DP), qui sont transcriptionnellement $CD4^+CD8^+$, mettent fin à l'expression du gène *Cd8* et deviennent des thymocytes $CD4^+CD8^{int}$ (étape a), et c'est à ce moment que le choix de la lignée est fait. La persistance de la signalisation du RCT chez les thymocytes $CD4^+CD8^{int}$ bloque la signalisation de l'interleukine-7 (IL-7) et induit la différenciation des thymocytes $CD4^+CD8^-$ (CD4SP) (étape b). L'arrêt ou de perturbation de la signalisation du RCT chez les thymocytes $CD4^+CD8^{int}$ permet une signalisation de l'IL-7, qui induit les thymocytes $CD4^+CD8^{int}$ à subir un renversement de corécepteur et de devenir $CD4^-CD8^+$ et de se différencier en cellules T $CD8^+$ (CD8SP) (étape c). Tiré de ¹⁸⁴.

Finalement, plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans le choix CD4SP ou CD8SP. Les joueurs clés sont Th-POK, RUNX3, TOX et GATA-3 ^{106,155,187}. Th-POK et TOX et GATA-3 sont importants pour promouvoir le choix CD4SP, sans affecter la signalisation du RCT. En effet, les souris Th-POK^{-/-} sont caractérisées par l'absence de lymphocytes T $CD4^+$ périphériques. De plus, cette délétion dirige les thymocytes vers la lignée CD8SP, qui est restreint au CMH-II ^{188,189}. Une déficience en TOX induit l'arrêt de différenciation au stade TDS, car il n'y a pas de CD4SP ni de CD8SP chez ces souris. RUNX3 joue le rôle contraire, c'est-à-dire qu'il promouvait le choix CD8SP ¹⁹⁰. Récemment, RUNX3 a été montré capable de se lier sur le gène *Zbtb7b* (qui encode Th-POK) pour agir comme répresseur ¹⁹⁰.

1.3 LE RÔLE DE ERK3 DANS LE DÉVELOPPEMENT THYMIQUE

Il est important de mentionner que les travaux décrits dans cette section ne sont pas encore publiés (voir les annexes I à IV pour les figures). Avant mon arrivée dans le laboratoire, ma prédécesseur, Miriam Marquis, avait étudié le rôle de la MAPK non-conventionnelle ERK3 dans le développement thymique. Au départ, rien n'était connu sur le rôle que pouvait avoir ERK3 dans le développement thymique. Cependant, plusieurs études précédentes ont démontré qu'ERK3 était important lors des processus de différenciation. En effet, les transcrits de la molécule ERK3 augmentaient lors de la différenciation des cellules de carcinome embryonnaire P19 en cellules neuronales ou encore des cellules musculaires ⁵. De plus, une accumulation de ERK3 est détectable lors de la différenciation de myoblastes C2C12 en cellules musculaire ⁶². Il était donc très pertinent de connaître le rôle de ERK3 dans le développement thymique, car ce dernier comporte plusieurs étapes de différenciation et de prolifération.

Au départ, le groupe de Meloche a inséré le gène rapporteur *LacZ* dans la séquence codante de *Mapk6* (*Erk3*) pour permettre l'expression de *LacZ* ⁶⁴. Il a donc été possible de mesurer l'activité de la β -galactosidase en utilisant un de ces substrats, le Fluorescein Di- β -D-Galactopyranoside (FDG). Ceci avait pour but d'identifier les cellules exprimant ERK3. Par la suite, le patron d'expression de ERK3 a été caractérisé dans différentes populations de thymocytes grâce à l'expression de la β -galactosidase chez la souris *Erk3*^{+/-}. Ceci a été confirmé par une expérience de RT-PCR. L'expression d'ERK3 commence élevée chez les thymocytes DN et diminue au fur à mesure que les thymocytes deviennent matures. Puisque les MAPK conventionnelles jouent un rôle important dans le développement thymique et qu'ERK3 est également exprimée chez les différentes populations de thymocytes, il se pourrait bien que cette molécule joue un rôle dans le développement thymique. Par la suite, l'utilisation de souris nouveau-nées a été nécessaire pour la suite des expériences, puisque l'abolition de ERK3 chez la souris provoquait un décès

prématuré des nouveaux-nés. Pour commencer, une analyse des différentes populations de thymocytes avec une délétion pour ERK3 a été effectuée. Cette analyse a rapidement démontré qu'il n'y avait pas de différence dans les pourcentages de thymocytes DN et DP entre les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Toutefois, il y avait une différence au niveau du pourcentage des CD4SP. L'analyse des thymocytes CD8SP a été impossible, car ils ne sont pas encore présents chez les souris nouveau-nées. De plus, une analyse plus poussée des sous-populations de thymocytes DN (DN1 à DN4) a été effectuée. Cette analyse a démontré qu'il n'y avait aucune différence entre les *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Toutefois, une réduction de 50% du nombre total de thymocytes chez la souris *Erk3*^{-/-} a été remarquée. La réduction en nombre a été observée chez la majorité des thymocytes, mais est statistiquement significative pour les thymocytes DN1, DP et CD4SP (Annexe I - Figure 35).

Par après, l'état général des souris nouveau-nées *Erk3*^{-/-} a été analysée pour savoir si cela provoquait le phénotype observé. Pour répondre à cette hypothèse, l'utilisation du système de culture de thymus fœtal *in vitro* a été faite. Les FTOC (Fetal Thymic Organ Culture) sont une technique très utilisée par les immunologistes qui permet de récapituler le développement des lymphocytes T *in vitro*. Donc, des thymus de souris E14,5 *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-} ont été placés en culture pour 5 jours. Grâce à cette expérience, il a été démontré que l'effet de la délétion de ERK3 est intrinsèque au thymus et non à l'état des nouveau-nés, puisque la réduction du nombre de cellules était la même chez les thymocytes DP et CD4SP. Cependant pour les thymocytes DN et CD8SP, il n'y avait aucune différence (Annexe I - Figure 36).

Ensuite, l'étude la réduction du nombre de thymocytes DP chez la souris *Erk3*^{-/-} a été faite. Premièrement, il est possible que la réduction du nombre de DP était causée par la réduction du nombre de ETP qui se différencie pour donner naissance aux thymocytes DP. Donc, un tri de ETP de souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-} a été effectué et ces ETP ont été placés en co-culture avec des cellules OP9-DL1. Ceci permet la différenciation des ETP en thymocytes plus matures *in vitro*. Après 9 jours de différenciation, il n'y avait aucune différence entre le nombre de thymocytes DP

produit par les ETP *Erk3*^{+/+} et par les *Erk3*^{-/-}. Une autre possibilité qui expliquerait le nombre réduit de thymocytes DP était qu'il y avait un défaut de prolifération lors du passage de l'étape DN4 au stade thymocyte DP. Des tests de prolifération ont été effectués en injectant du BrdU chez la femelle gestante de 18,5 jours. Il n'y avait aucune différence dans l'incorporation de BrdU dans les thymocytes DN, ISP (les thymocytes de la transition DN4-DP). De plus, il y a une augmentation de l'incorporation de BrdU chez les thymocytes DP, qui va à l'encontre du fait qu'il y a une réduction massive du nombre de thymocytes DP. Une possibilité pour expliquer cette réduction était que les thymocytes DP qui ne prolifèrent pas sont éliminés. Pour répondre à cette question, l'apoptose a été mesurée chez les thymocytes DP, par un marquage TUNEL. Une augmentation de cellules TUNEL⁺ indiquerait une augmentation de l'apoptose. Toutefois, aucune différence dans la proportion de cellules TUNEL⁺ entre les thymocytes DP des souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-} n'a pu être observé. Cependant, avec une analyse plus poussée des thymocytes DP, grâce à l'expression du RCT, une augmentation de l'apoptose uniquement chez les thymocytes DP exprimant un fort niveau de RCT (DP RCT^{fort}) a été remarquée. Toutefois, puisque cette population représente uniquement 2-5% des thymocytes DP totaux, elle ne peut pas expliquer la diminution de 50% du nombre de thymocytes DP chez la souris *Erk3*^{-/-} (Annexe I - Figure 37).

En analysant le niveau d'expression du RCT chez les thymocytes DP, il a été remarqué qu'il y avait moins de thymocytes DP exprimant un niveau intermédiaire du RCT chez la souris *Erk3*^{-/-}. Puisque l'expression intracellulaire de la chaîne β du RCT était similaire chez la souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}, est ce qu'il y a un défaut du réarrangement de la chaîne α du RCT et une accumulation de bris double brin de l'ADN chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}? Effectivement, grâce à un marquage qui cible la phosphorylation de l'histone H2AX, un marqueur de bris double de l'ADN, il a été démontré qu'il y avait une accumulation de bris double brin de l'ADN chez les thymocytes DP provenant de la souris *Erk3*^{-/-}. Pour continuer, ces bris double brin de l'ADN étaient causés par la protéine RAG, qui est requise pour le réarrangement de segments de gène V(D)J chez les thymocytes DP. En effet, en utilisant des souris

RCT transgéniques RAG-déficientes, l'accumulation de phospho-H2AX est abolie et le nombre total de thymocytes est restauré. La protéine ERK3 semble donc être importante pour la réparation de bris double brin de l'ADN (Annexe I - Figure 38).

L'utilisation de chimères hématopoïétiques a démontré que la réduction du nombre de thymocytes est intrinsèque aux cellules T. Toutefois, le bloc partiel de la voie de différenciation des thymocytes CD4SP ne l'est pas, car la proportion des thymocytes CD4SP est restaurée. Une délétion de ERK3 uniquement chez les thymocytes n'est donc pas suffisante pour causer un problème de différenciation des thymocytes DP vers les thymocytes CD4SP. De plus, en éliminant ERK3 de l'épithélium thymique, le phénomène de réduction des thymocytes CD4SP n'est pas observé. Ceci a été validé grâce à des chirurgies de thymus *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-} sous la capsule du rein d'une souris de type sauvage ne possédant pas de lymphocytes T CD8. Donc, une abolition de ERK3 chez les thymocytes et une abolition de ERK3 chez cellules épithéliales du thymus sont nécessaires pour causer le défaut de différenciation des thymocytes DP vers les thymocytes CD4SP.

1.4 PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSES

Le labo d'accueil a démontré pour la première fois qu'ERK3 semble jouer un rôle très important lors du développement thymique. Cependant, beaucoup de questions ne sont pas encore répondues. Premièrement, pourquoi il y a moins de thymocytes DP chez la souris déficiente pour ERK3 ? À la suite des résultats de Miriam, nous posons comme hypothèse que les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} sont plus sensible à l'apoptose que les thymocytes DP sauvage. Pour répondre à notre hypothèse, nous allons mesurer l'apoptose avec plusieurs techniques différentes, tel que la cytométrie en flux, l'immunohistochimie et la culture *in vitro* de thymocytes. En parallèle, nous avons posé une seconde hypothèse pour identifier la cause de la réduction du nombre de thymocytes DP *Erk3*^{-/-}. Nous posons l'hypothèse que la demi-vie des thymocytes DP *Erk3*^{-/-} est plus courte que ceux de type sauvage, puisque des expériences préliminaires nous ont indiqué que les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} sont en moins grand nombre après une période d'incubation que les thymocytes DP de type sauvage. Pour répondre à notre hypothèse, nous allons mettre en culture des thymus fœtaux pendant 5 et 6 jours pour voir si le nombre de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} diminuera plus rapidement chez les thymocytes DP de type sauvage. De plus, nous allons mesurer les réarrangements secondaires distaux du locus alpha lors de la recombinaison V(D)J par PCR semi-quantitatif, puisque les thymocytes DP doivent posséder une longue demi-vie pour réarranger les régions les plus distaux des segments variables (V) et jonctionnelles (J) et aussi pour essayer différents réarrangements.

Par la suite, il a été démontré qu'une déficience en ERK3 affectait la transition des thymocytes DP vers les thymocytes CD4SP. En effet, il y a une forte réduction du pourcentage et du nombre de cellules des thymocytes CD4SP ERK3 déficient chez les nouveau-nés. De plus, dans des cultures de thymus fœtaux, elle a observé le même phénotype. Nous posons donc comme hypothèse que la réduction du pourcentage et du nombre de thymocytes CD4SP *Erk3*^{-/-} est causée par un défaut de sélection positive des thymocytes DP. Pour répondre à notre hypothèse, nous allons phénotyper les thymocytes DP en utilisant les marqueurs classiques de la sélection

positive, soit le CD69, le CD5 et le RCT. De plus, nous allons stimuler les cellules *in vitro* avec de l'anti-CD3 pour regarder l'augmentation de l'expression de ces molécules. De plus, nous allons aussi regarder l'expression de ces molécules dans des souris RCT transgéniques.

Pour continuer, au tout début de ma maîtrise, j'ai pu obtenir la souris MK5 déficiente du laboratoire du Dr Sylvain Meloche, qui provient du laboratoire de Gaestel. MK5 est un substrat de ERK3. Cependant, aucune étude ne portait sur le rôle de MK5 dans le développement thymique et que peut-être, la fonction de ERK3 dans le thymus serait médiée par MK5. Nous posons donc comme hypothèse que la fonction de ERK3 dans le thymus est médiée par MK5. Pour vérifier cette hypothèse, nous allons procéder à un phénotypage des thymocytes de la souris MK5 déficiente par cytométrie en flux.

Finalement, le laboratoire du Dr Meloche a réussi à faire une souris ERK3, dont le domaine kinase est inactif. Donc, la protéine est présente dans la cellule, mais ne peut pas exercer de fonction activatrice. Nous posons alors comme hypothèse que le domaine kinase serait important pour provoquer le phénotype observé dans le thymus de la souris ERK3 déficiente. Il est important de noter ici que les souris ERK3 « kinase dead » ne meurent pas à la naissance, donc nous allons utiliser des souris adultes (données non publiées). Pour vérifier notre hypothèse, nous allons également phénotyper le thymus de la souris ERK3 « kinase dead » par cytométrie en flux.

En résumé, voici les questions qui seront abordées dans ce mémoire :

- 1) Pourquoi y a t'il moins de thymocytes DP chez la souris ERK3 déficiente ?
 - a. Est-ce qu'il y a une augmentation de l'apoptose chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} ?
 - b. Est-ce que la demi-vie des thymocytes DP *Erk3*^{-/-} est plus courte que chez les thymocytes de type sauvage ?

- 2) Pourquoi y a t'il moins de thymocytes CD4SP chez la souris *Erk3*^{-/-} ?
 - a. Est-ce qu'il y a un défaut de la sélection positive chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} ?
- 3) Est-ce que la fonction de ERK3 dans le thymus est médiée par MK5 ?
- 4) Est-ce que le domaine kinase de ERK3 est important pour médier sa fonction dans le thymus ?

CHAPITRE 2. MÉTHODOLOGIE

2.1 Souris utilisées

Les souris *Erk3*^{-/-} ont été générées dans le laboratoire du Dr Meloche ⁶⁴. Les souris ERK3 Knock In ayant un domaine kinase inactif (KI) ont également été générées dans le laboratoire du Dr Meloche (données non publiées). Les souris *Mk5*^{-/-} ont été générées dans le laboratoire du Dr Gaestel ⁷⁴. Les souris ERK3 hétérozygotes sur fond 129/SvEv et les souris ERK3 hétérozygotes sur fond C57BL/6 ont été croisées ensembles pour donner une progéniture de fond mixte. Les souris ERK3 hétérozygotes sur fond mixte ont été croisées ensembles pour donner les souris de travail (ERK3 homozygote type sauvage et ERK3 homozygote déficiente). Les souris OT-I et OT-II RCT transgénique déficientes pour RAG-2 proviennent de chez Taconic (Taconic, CAT# 2334 et 1896). Ces souris ont été croisées avec des souris *Erk3*^{+/-} et intercroisées pour obtenir des souris *Erk3*^{-/-} OT-I/*Rag-2*^{-/-} ou OT-II/*Rag-2*^{-/-}. Le génotypage des souris a été fait par PCR.

2.2 Anticorps

Les anticorps anti-CD4 (RM4-5), anti-CD8 (53-6.7), anti-Caspase-3 activée (C92-605) et Annexin-V ont été achetés chez BD Bioscience. Les anticorps anti-V α 2 (B20.1), anti-TCR (H57-597) et anti-CD5 (53-7.3) ont été achetés chez Biolegend. L'anticorps anti-CD69 (H1.2F3) a été acheté chez Cederlane.

2.3 Cytométrie en flux (marquage extracellulaire)

Les marquages extracellulaires ont été fait de la façon suivante. Les thymus de souris au jour 19 embryonnaire (E19) ont été dissociés à l'aide de lame de microscope givrée. Par la suite, une suspension cellulaire a été faite pour ensuite être comptée. 1 million de cellules a été placées dans des puits de plaques à 96 puits. Les cellules ont été centrifugées à 1300 rpm pendant 5 min et marquées avec un mélange de tampon pour FACS (FACSwash : 10g/L de DMEM en poudre, 3% de sérum de cheval, 1M

de Hepes et 10% d'azide de sodium) et d'anticorps, titrés de façon optimale. Les cellules ont ensuite été incubées sur glace pendant 15 minutes (sauf avis contraire), suivies de deux lavages avec du FACSwash. Les cellules ont été lues sur le FACSCalibur de BD Bioscience ou sur le FACSCanto de BD Bioscience. Le logiciel FlowJo version 9 de la compagnie TreeStar a été utilisé pour l'analyse des données.

2.4 Détection de la caspase-3 clivée par cytométrie en flux

Des thymus de souris E19 *Erk3*^{+/+} et de souris *Erk3*^{-/-} ont été dissociés à l'aide de lame de microscope givrée. Par la suite, une suspension cellulaire a été faite pour ensuite être comptée. 1 million de cellules a été placées dans des puits de plaques à 96 puits. Les cellules ont été centrifugées à 1300 rpm pendant 5 min et marquées avec un mélange de FACSwash et d'anticorps extracellulaire (anti-CD4 et anti-CD8), titrés de façon optimale. Les cellules sont ensuite incubées sur glace pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées une fois avec du FACSwash. Par la suite, les cellules ont été fixées avec le tampon cytofix/cytoperm de BD bioscience selon le protocole du manufacturier. Ensuite, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-caspase-3 clivée pour une heure à la température de la pièce à l'abri de la lumière. Enfin, les cellules ont été lavées à deux reprises avec le tampon Perm Wash Buffer de BD Bioscience. Les cellules ont été lues sur le FACSCalibur de BD Bioscience ou sur le FACSCanto de BD Bioscience. Le logiciel FlowJo version 9 de la compagnie TreeStar a été utilisé pour l'analyse des données.

2.5 Détection de la caspase-3 clivée par immunohistochimie

Des thymus de souris E19 *Erk3*^{+/+} et de souris *Erk3*^{-/-} ont été fixés avec 10% de formaline. Par la suite, les tissus ont été emparaffinés et coupés en section de 10 microns. L'immunohistochimie a été fait sur un immunostainer (Discovery XT

system, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Pour éliminer la formation de cross-link de protéine causée par la fixation à la formaline, les tissus ont été traités avec des tampons citrates. Un anticorps anti-caspase 3 clivée (1/100, Biocare Medical) de lapin a été appliqué pendant 2 heures à température pièce sur tous les tissus. Par la suite, les sections ont été incubées avec un anticorps secondaire biotinylisé spécifique à l'anticorps de lapin. La streptavidine couplée à de la peroxydase de raifort et de la 3,3-diaminobenzidine ont été utilisées selon le protocole du manufacturier (Ventana Medical Systems). Finalement, les sections ont été colorées avec de l'hématoxyline et l'éosine. Les sections ont été numérisées avec le NanoZoomer® Digital Pathology system de Hamamatsu.

2.6 Coloration histologique à la hématoxyline et à l'éosine

Des thymus de souris E19 *Erk3*^{+/+} et de souris *Erk3*^{-/-} ont été fixés avec 10% de formaline. Par la suite, les tissus ont été emparaffinés, coupés en section de 10 microns, puis colorés avec de la hématoxyline et l'éosine selon la méthode du manufacturier Hamamatsu. Les sections ont été numérisées avec le NanoZoomer® Digital Pathology system de Hamamatsu.

2.7 Mort cellulaire *in vitro*

Des thymus de souris E19 *Erk3*^{+/+} et de souris *Erk3*^{-/-} ont été prélevés et dissociés en cellules à l'aide de lames de microscope givrées. Par la suite, les thymocytes ont été comptés et 0,5 million de thymocytes ont été placés en culture dans un milieu RPMI contenant 2% de sérum de bovin fœtal (FBS) pour évaluer la survie des cellules au cours du temps (3 heures plus tard). Après culture, les cellules ont été marquées pour analyse en cytométrie en flux comme suit : 0,5 million de cellules ont été incubé avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 pendant 15 minutes sur glace à l'abri de la

lumière. Les cellules ont été lavées deux fois avec du Binding Buffer (Hepes/NaOH 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM). Par la suite, les cellules ont été marquées avec un mélange de 7-AAD et d'Annexin-V pendant 5 minutes sur glace. Immédiatement après l'incubation, les cellules ont été lues sur le FACSCanto de BD Bioscience.

2.8 Culture de thymus fœtaux (FTOC)

Des thymus ont été récoltés au jour embryonnaire E14,5 de la souris type sauvage et la souris déficiente pour ERK3. Par la suite, ces thymus ont été placés sur la surface de membranes Nuclepore Track-Etch avec des pores de 0,8 µm (Fisher Scientific, CA). Ensuite cette membrane a été placée sur 2 mL de milieu complet d'Iscove' Modified Dubelcco's Medium (1% pénicilline/streptomycine, 1% glutamine, 10% FBS et 50µM β-ME) (Sigma Chemicals Co., St-Louis, MO). Les thymus ont ensuite été incubés pendant 5 et 6 jours à 37°C et 5% de CO₂. Voir la méthodologie 2.3 pour la suite du procédé.

2.9 PCR semi-quantitatif pour les réarrangements secondaires de la chaîne α du RCT

Des thymus de souris E19 *Erk3*^{+/+} et de souris *Erk3*^{-/-} ont été récoltés et placés immédiatement dans du TRIZOL (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), pour en extraire l'ARN, selon le protocole du manufacturier. L'ARN (2 µg) a été converti en ADNc par transcription inverse. Par la suite, cet ARN a été chauffé à 65°C pendant 5 minutes. Après, l'ARN a été mélangé avec un mélange RT-PCR (dNTP 2,5 mM, DTT 0,1 M, 20 ng d'oligo DT, tampon RT 5X, RNase Out et RT Superscript II) et incubé pendant 1 heure à 42°C. L'ADNc obtenu a été dilué 7 fois en série. Par la suite, les ADNc ont été incubés avec différentes combinaisons de paires d'amorces (Tableau II) pour évaluer les réarrangements secondaires de la chaîne α du RCT. A la fin, les produits PCR ont été mis sur un gel d'agarose 2%. Les photos de gels ont été

prises à l'aide d'un Alpha Imager. La quantification de l'intensité des bandes a été faite à l'aide du logiciel ImageJ.

Tableau II. Noms et séquences d'amorce utilisés pour la PCR semi-quantitative des réarrangements secondaires du RCT α

Nom de l'amorce	Séquence
Vα3-Forward	5'-CCCAGTGGTTCAAGGAGTGA-3'
Vα6-Forward	5'-CTGACTCATGTCAGCCTGAGAG-3'
Vα8-Forward	5'-CAACAAGAGGACCGAGCACC-3'
Vα14-Forward	5'-TGGGAGATACTCAGCAACTCTGG-3'
Vα19-Forward	5'-CTGCTTCTGACAGAGCTCCAG-3'
Jα2-Reverse	5'-ACCACTTAGTCCTCCAGTATTC-3'
Jα18-Reverse	5'-CAGGTATGACAATCAGCTGAGTCC-3'
Jα30-Reverse	5'-AGATGTGTCCCTTTTCCAAAGATG-3'
Cα-Forward	5'-TTCAAAGAGACCAACGCCAC-3'
Cα-Reverse	5'-TTCAGCAGGAGGATTCGGAG-3'

2.10 Stimulation *in vitro* des thymocytes

Des plaques 24 puits (Sarstedt) ont été incubées pendant 2 heures à 37°C avec du PBS ou avec 10 μ g/mL d'anti-CD3 (145-2C11) diluée dans du PBS, pendant 2 heures à 37°C. Après avoir lavé les puits 3 fois avec du PBS, 2 millions de thymocytes ERK3 WT et KO totaux ont été placés en culture dans du milieu RPMI complet (10 % de FBS, 1% de L-glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine, 1% d'acides aminés non-essentiels, 1% Hepes, 1 % de sodium pyruvate et 0,1% de β -mercapthoéthanol) pendant 24 heures. Après la récolte des cellules, ces dernières ont été marquées avec de l'anti-CD4, de l'anti-CD8 et du 7-AAD (pour éliminer les cellules mortes, 7-AAD⁺). Les anticorps anti-CD69 et anti-CD5 ont également été utilisés. Les cellules ont été lues sur le FACSCanto de BD Bioscience.

2.11 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism version 5 de GraphPad. Le test utilisé est le test Mann-Whitney. Les différences statistiques sont représentées par les symboles suivant : * : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$ et *** : $p > 0,001$.

CHAPITRE 3. RÉSULTATS

3.1 Pourquoi y a-t-il moins de thymocytes DP chez la souris *Erk3*^{-/-} ?

3.1.1 Analyse du développement thymique au jour embryonnaire 19 (E19) en absence de ERK3

Notre première mission était de regarder les niveaux d'apoptose chez les thymocytes DP d'une souris déficiente pour ERK3 et d'une souris normale. La souris *Erk3*^{-/-} meurt environ une heure après la naissance ⁶⁶, et donc nous avons opté pour des souris au stade embryonnaire E19. En effet, il était préférable d'euthanasier la femelle gestante au stade E19 pour être sûr que les souris ERK3 déficiente soit encore vivantes et manipulables.

Nous avons phénotypé le thymus de souris E19 déficiente pour ERK3, (Figure 15). En effet, nous avons utilisé les marqueurs CD4 et CD8 pour différencier les sous-populations de thymocytes dans le thymus grâce à la cytométrie en flux. Afin de faciliter l'analyse, nous nous sommes uniquement concentrés sur les thymocytes DP (CD4⁺CD8⁺), les thymocytes qui sont en transition entre le stade double positif et le stade simple positif (TDS (CD4⁺CD8^{int})) et les thymocytes CD4SP (CD4⁺CD8⁻). Nous pouvons remarquer qu'il y a moins de thymocytes totaux en moyenne (8 millions de cellules pour la souris type sauvage et 5,5 millions pour la souris *Erk3*^{-/-}) (Figure 15B), tout comme chez les souris nouveau-nées (Annexe I - figure 35). Cependant, la diminution du nombre de thymocytes totaux *Erk3*^{-/-} chez les nouveau-nées est plus grande que celle des souris E19 de type sauvage. Lorsque nous comparons les sous-populations de thymocytes (Figures 15A et 15C), nous remarquons que la proportion de thymocytes DP est équivalente entre les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} et les thymocytes de type sauvage (environ 70%), tout comme chez la souris nouveau-née (Annexe I - figure 35). De plus, nous observons qu'il y a une réduction significative du nombre de thymocytes DP *Erk3*^{-/-}.

Dans le cas des thymocytes CD4SP, nous voyons clairement une différence significative au niveau du pourcentage (moyenne de 2,75 % de CD4SP chez la souris type sauvage et moyenne de 1% chez la souris *Erk3*^{-/-}) et du nombre (moyenne de 0,2 million de cellules CD4SP chez la souris type sauvage et 0,05 million de cellules CD4SP chez la souris *Erk3*^{-/-}) de CD4SP (Figures 15A et 15C). Nous observons le même phénomène chez les souris nouveaux-nées déficientes pour ERK3 (Figures 15A et 15C).

Pour détailler davantage l'analyse des sous-populations de thymocytes, nous avons analysé les thymocytes en transition entre les thymocytes DP et les thymocytes CD4SP (TDS). Cette étape représente les thymocytes DP qui ont passé avec succès la sélection positive. De plus, ces cellules nous indiquent le stade précis des étapes de sélection, car ces cellules ont passé la sélection positive. Nous pouvons remarquer dans la figure 15A, que chez la souris *Erk3*^{-/-}, il y effectivement une diminution du pourcentage (1,8 % chez les thymocytes TDS de type sauvage et de 0,9% chez la souris *Erk3*^{-/-}) et du nombre de cellules (0,12 million de cellules chez les thymocytes TDS type sauvage et 0,05 million de cellules chez les thymocytes TDS *Erk3*^{-/-}). De plus, il est impossible d'analyser les thymocytes CD8SP, car ils arrivent plus tard dans le développement T. Donc, il est possible de poursuivre les études en utilisant le modèle de souris E19 déficient pour ERK3.

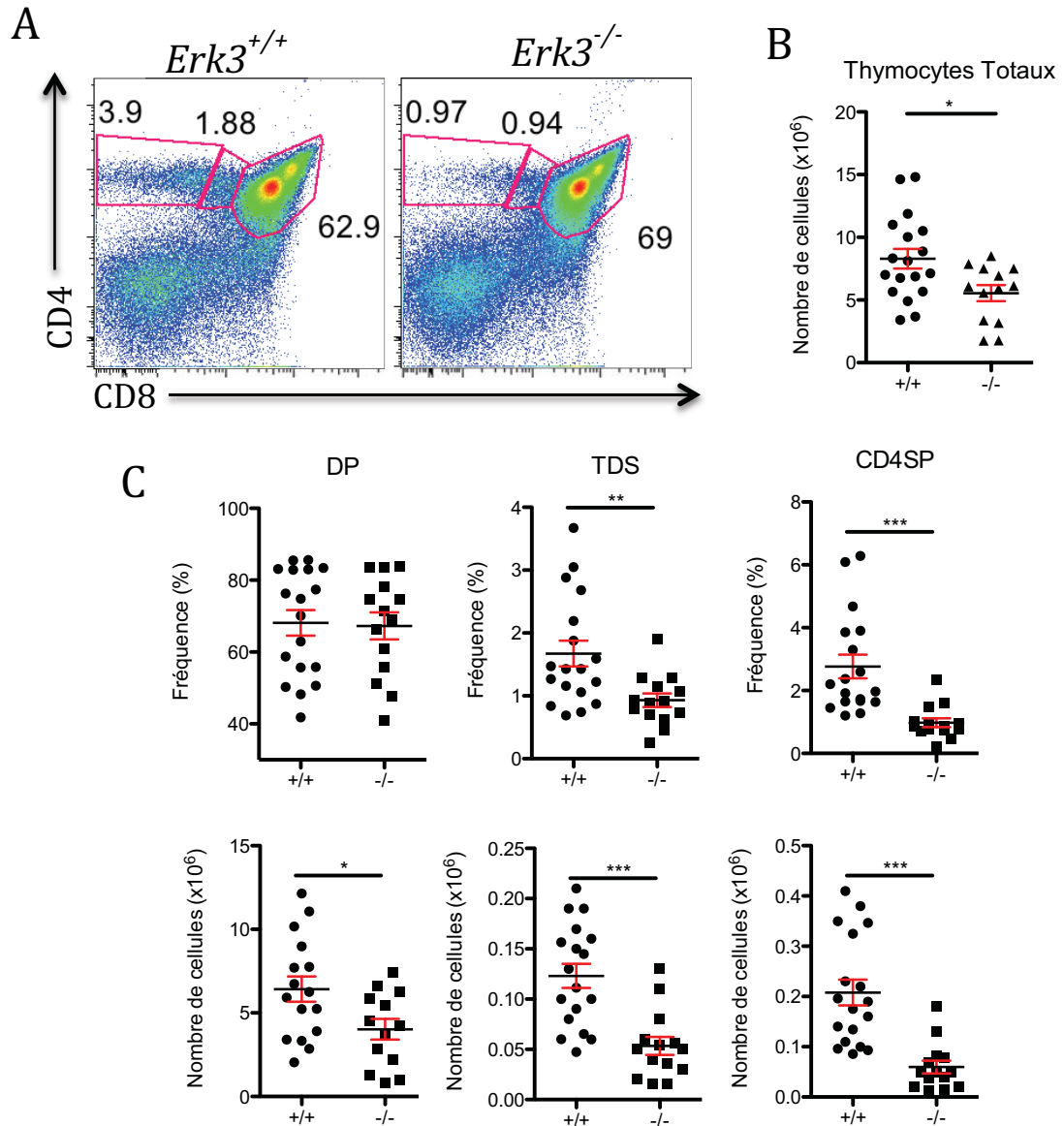


Figure 15. Diminution du nombre de thymocytes totaux, de thymocytes TDS et thymocytes CD4SP en absence de ERK3 au jour embryonnaire 19 (A) Les profils CD4/CD8 de cytométrie en flux sont montrés pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Le pourcentage des différentes populations de thymocytes est inscrit à proximité de leur population respective. Résultats représentatifs de 6 expériences indépendantes. (B) Réduction du nombre de thymocytes totaux chez la souris au jour embryonnaire 19 en absence de ERK3. La cellularité totale du thymus est montrée pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (* : $p > 0,05$). (C) Différence au niveau du pourcentage et du nombre cellulaire des thymocytes TDS et CD4SP chez la souris E19 *Erk3*^{-/-}. La cellularité des thymocytes DP, TDS et CD4SP est montrée pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Le pourcentage des thymocytes DP, TDS et CD4SP est également montré. Le trait rouge représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la

moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (** : $p > 0,01$; *** : $p > 0,001$).

3.1.2 Est-ce qu'il y a une augmentation de l'apoptose chez les thymocytes DP n'exprimant pas ERK3 ?

Après avoir analysé le développement thymique chez les souris déficientes pour ERK3, nous avons les outils pour permettre de répondre à la question : pourquoi y-a-t-il moins de thymocytes DP *Erk3*^{-/-}. S'il y a moins de thymocytes DP chez la souris *Erk3*^{-/-}, c'est parce qu'ils y a plus thymocytes qui meurent. Donc, mon premier objectif de maîtrise était de savoir si les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} meurent plus à cause du haut niveau d'apoptose. Plusieurs molécules, dont Bax, Bim, Bak, Bcl-X_L, étaient disponibles pour l'analyse de l'apoptose chez les thymocytes DP¹⁶⁹. Il existe deux grandes voies de l'apoptose. La première est la voie intrinsèque, qui est contrôlée par les membres de la famille de Bcl-2 et la deuxième est la voie extrinsèque, qui est contrôlée par la signalisation des récepteurs de mort. Cependant, elles aboutissaient toutes vers le clivage de la molécule effectrice nommée caspase-3. Donc, lorsque la caspase-3 est clivée, elle induit le phénomène d'apoptose. Afin d'évaluer les niveaux d'apoptose chez les thymocytes DP, nous avons utilisé deux approches différentes. Premièrement, nous avons vérifié les niveaux de la caspase-3 clivée dans les thymocytes DP grâce à la cytométrie en flux. Nous avons préféré cette technique à celle de l'immunobuvardage de type Western, principalement à cause du faible nombre de cellules totales dans un thymus de souris E19. Avec 1 million de cellules, nous avons la possibilité de faire les analyses par cytométrie en flux. Nous avons utilisé comme contrôle positif des thymocytes en culture à 37°C pendant 24 heures (données non-montrées).

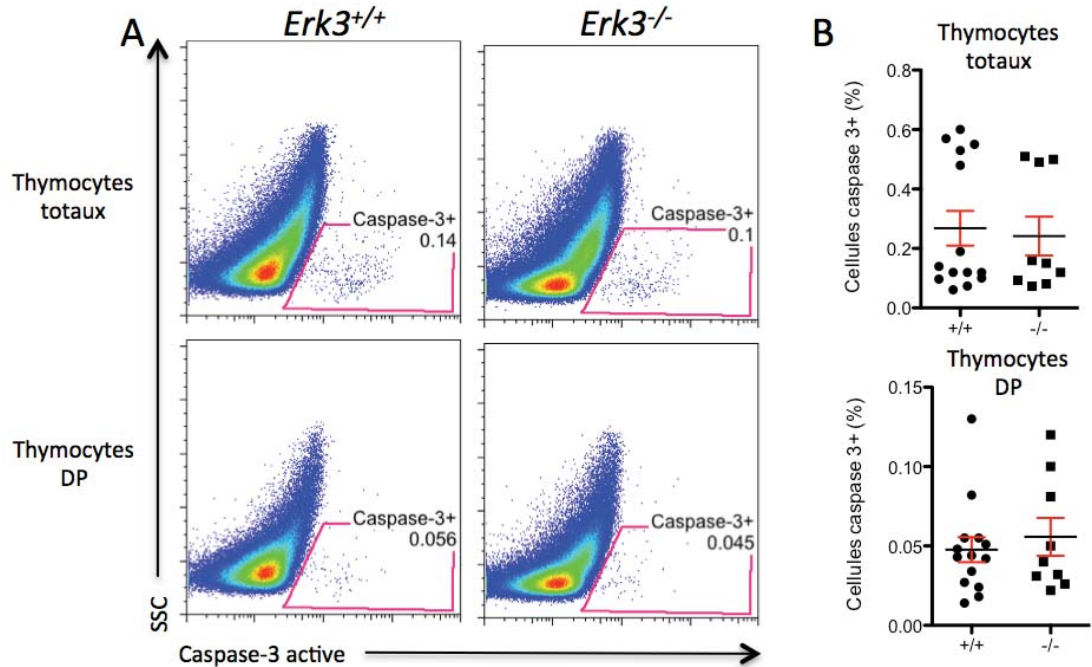


Figure 16. Aucune différence du niveau apoptose détectée lors d'un marquage intracellulaire de la caspase-3 clivée chez les souris E19 *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. (A) Les profils SSC/Caspase-3 clivée sont montrés pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Les profils du haut représentent les thymocytes totaux et les profils du bas représentent la population de thymocytes DP. Le pourcentage des cellules caspase-3 clivée positives est inscrit sur les profils de cytométrie (B) Le pourcentage des cellules caspase-3 clivée positive chez les thymocytes totaux et la population de thymocytes DP est montré pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. La ligne rouge représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Représentatif de 3 expériences indépendantes.

Tout d'abord, nous avons analysé les niveaux de caspase-3 clivée dans les thymocytes totaux (Figure 16A, panneaux du haut). Grâce au profil SSC (pour voir la complexité cellulaire) et FSC (pour voir la taille des cellules), nous avons pu identifié les thymocytes. Par la suite, nous avons éliminé les doublets de l'analyse. Par après, nous avons sélectionné les thymocytes avec les paramètres SSC et caspase-3 clivée. Les cellules caspase-3⁺ et SSC^{faible} sont les cellules qui sont en apoptose¹⁹¹. Ce que nous remarquons, c'est qu'il n'y a aucune différence significative pour le pourcentage (environ 0,24 % pour le WT et le KO) de cellules caspase-3⁺ entre les thymocytes totaux *Erk3*^{-/-} et les thymocytes type sauvage (Figure 16A et 16B, panneaux du haut). Par la suite, nous avons fait la même analyse sur la population de thymocytes DP (Figure 16A, panneaux du bas). Nous observons qu'il n'y pas de différence

significative pour le pourcentage de cellules caspase-3⁺ chez les thymocytes DP de type sauvage et mutant.

Lors du développement normal des lymphocytes T dans le thymus, plus de 90% des thymocytes DP meurent par apoptose^{169,191}. Nous trouvons anormal de voir si peu de thymocytes DP caspase-3⁺ dans notre expérience. Nous nous sommes alors posés la question à savoir si l'incapacité de détecter une différence au niveau des cellules caspase-3 positives chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} ne serait pas à cause de la présence des macrophages dans le thymus. Les macrophages sont les cellules principales qui éliminent, de façon très efficace, les thymocytes en apoptose dans le thymus. Il a fallu de nombreuses années aux immunologistes pour trouver les cellules apoptotiques dans le thymus¹⁵⁶. De plus, lorsque nous défaisons le thymus avec les lames givrées pour obtenir les cellules, nous enlevons le stroma, le tissu contenant les macrophages. En éliminant le stroma, nous obtenons uniquement des thymocytes DP en vie, puisque tous les macrophages ont englouti la presque totalité des cellules en apoptose¹⁵⁶. Nous avons donc opté pour une approche histologique pour évaluer les niveaux d'apoptose dans les thymus de souris déficiente pour ERK3.

Premièrement, nous avons réalisé un marquage histologique grâce à la hématoxyline et à l'éosine. Ce marquage permet de différencier les deux régions du thymus grâce à la densité cellulaire. En effet, la région qui est d'un mauve plus foncé (plus dense à cause du nombre élevé de cellules dans un même espace) représentent le cortex (Figure 17A, C) tandis que la région qui est d'un mauve plus clair (et donc moins dense) constitue la médulla (Figure 17A, M). Nous savons que la cellularité totale des thymocytes est plus petite en absence de ERK3 (Figure 15B). De plus, suite à des observations faites lors du prélèvement des thymus, nous constatons que la taille du thymus des souris *Erk3*^{-/-} est réduite par rapport au type sauvage.

Nous avons quantifié la superficie des thymus en convertissant un pixel d'image, acquise sur NPD.view de Hamamatsu, en millimètre (mm). En effet, nous avons un thymus *Erk3*^{-/-} beaucoup plus petit qu'un thymus de type sauvage (figure

17). Cette conversion a été faite par le logiciel Photoshop CS5 d'Adobe. En compilant nos résultats, nous voyons clairement la diminution d'environ 50% de la taille totale du thymus (Figure 17B). De plus, le logiciel Photoshop CS5 d'Adobe nous a même permis de séparer la médulla et le cortex du thymus total, grâce à la densité des cellules. Nous constatons que la médulla semble être moins grosse chez le thymus d'une souris *Erk3*^{-/-}. En effet, un thymus normal présente une grosse médulla, tandis que le mutant ERK3 a une médulla plus petite (Figure 17A et 17B). De plus, nous observons le même phénomène pour le cortex. Le cortex du mutant ERK3 est réduit par rapport au cortex de type sauvage. Donc, toutes les parties du thymus d'une souris *Erk3*^{-/-} sont significativement plus petites que le thymus d'une souris normale. En plus de mesurer la superficie des thymus, nous avons déterminé les proportions de la médulla et du cortex. Nous ne remarquons aucune différence significative au niveau des proportions, ce qui nous indique que c'est le thymus en entier qui est réduit.

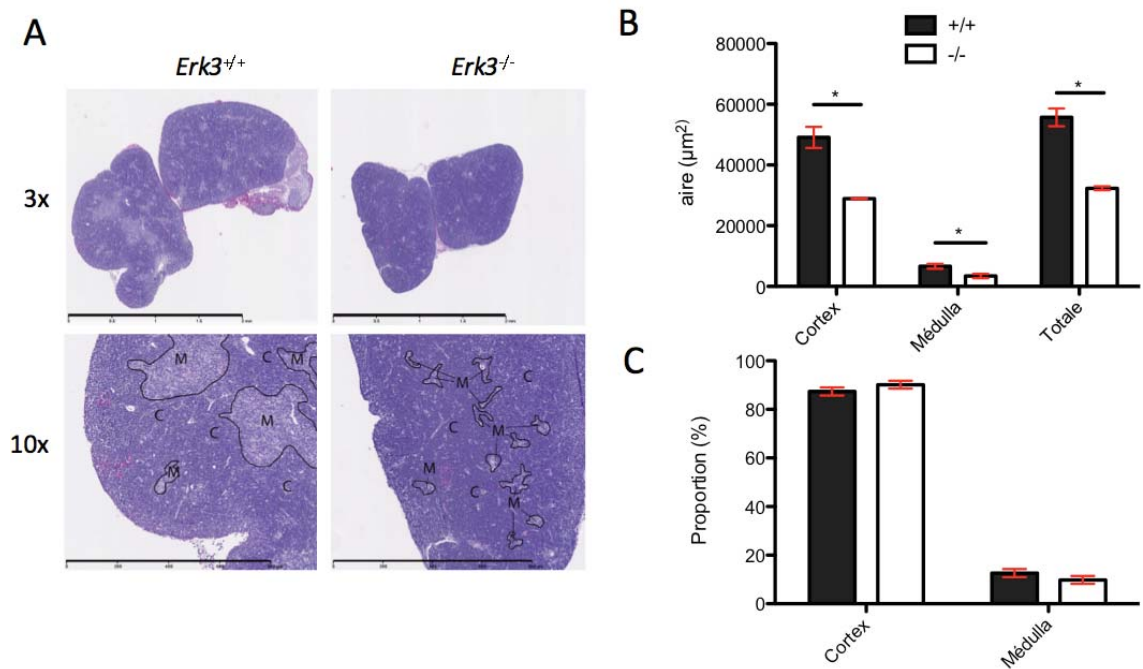


Figure 17. Analyse histologique du thymus de souris E19 *Erk3*^{-/-}. (A) Une coloration à l'hématoxyline/éosine a été effectuée sur des sections de thymus de 10 μm d'épaisseur sur des embryons de souris *Erk3*^{+/+} (gauche) et *Erk3*^{-/-} (droite) de 19 jours pour observer la densité cellulaire. Le grossissement de la partie du haut est de 3 fois et la ligne épaisse représente 2 mm. Le grossissement de la partie du bas est de 10 fois et la ligne épaisse représente 800 μm. La médulla est indiquée par la lettre « M » (partie moins dense) et le cortex est indiqué par la lettre « C » (partie plus dense). Les photos ont été prises avec le

logiciel NPD.view de Hamamatsu. **(B)** La taille du thymus est significativement plus petite chez la souris *Erk3^{-/-}*. Les aires du thymus total, du cortex et de la médulla sont montrées en histogramme pour les souris *Erk3^{+/+}* (barre noire) et *Erk3^{-/-}* (barre blanche). L'aire totale des thymus *Erk3^{+/+}* et *Erk3^{-/-}* a été mesurée, ainsi que les parties cortex et médulla, par le logiciel Photoshop CS5 d'Adobe. La surface, en pixels, a été convertie en μm par Photoshop. Les barres rouges représentent l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.). Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (* : $p > 0,05$) **(C)** Pourcentage du cortex et de la médulla du thymus total chez les souris *Erk3^{+/+}* et *Erk3^{-/-}*. Le pourcentage du cortex et de la médulla du thymus total est montré en histogramme pour les souris *Erk3^{+/+}* (barre noire) et *Erk3^{-/-}* (barre blanche). Les barres rouges représentent l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.). Représentatif de 4 souris *Erk3^{+/+}* et de 4 souris *Erk3^{-/-}*.

Notre but premier était de mesurer l'apoptose grâce à une technique immunohistochimique, où la caspase-3 clivée est détectée à l'aide d'un anticorps par une réaction à la peroxydase. Cependant, puisque la taille des thymus de souris *Erk3^{-/-}* et de type sauvage n'est pas équivalente, il a fallu connaître la superficie du thymus et de ces différentes parties pour pouvoir comparer ces souris. En connaissant la superficie des thymus, nous avons pu continuer avec la mesure de l'activité apoptotique des thymus *Erk3^{-/-}* par immunohistochimie (Figure 18). Dans cette figure, nous observons des coupes de thymus de souris E19 *Erk3^{-/-}* et de type sauvage, agrandies de 15 fois. Nous avons analysé 4 souris WT et 4 souris ERK3 KO. De plus, chaque souris comportait 3 coupes séquentielles à compter, situées au centre du thymus, pour un total de 24 coupes. Pour être sûr de ne pas biaiser les comptes de cellules caspase-3⁺ (en brun sur la Figure 18A), nous avons opté pour des comptes à l'aveugle, puisque nous connaissons le génotype de chaque souris au départ. Donc, trois personnes différentes ont compté de la même façon les cellules caspase-3⁺. Chaque lame a été comptée et les comptes cellulaires ont été compilés. Nous observons dans la figure 18B, qu'il n'y a aucune différence en apoptose entre la souris *Erk3^{-/-}* et la souris de type sauvage. Ceci est vrai pour chaque partie du thymus. Les thymocytes DP sont situés dans la région de cortex et nous nous attendions à y voir une augmentation de l'activité apoptotique chez la souris *Erk3^{-/-}*, mais ce n'est pas le cas. En conclusion, nous n'avons pas pu trouver de différence au niveau de l'apoptose entre les souris déficiente pour ERK3 et de type sauvage avec un marquage immunohistochimique.

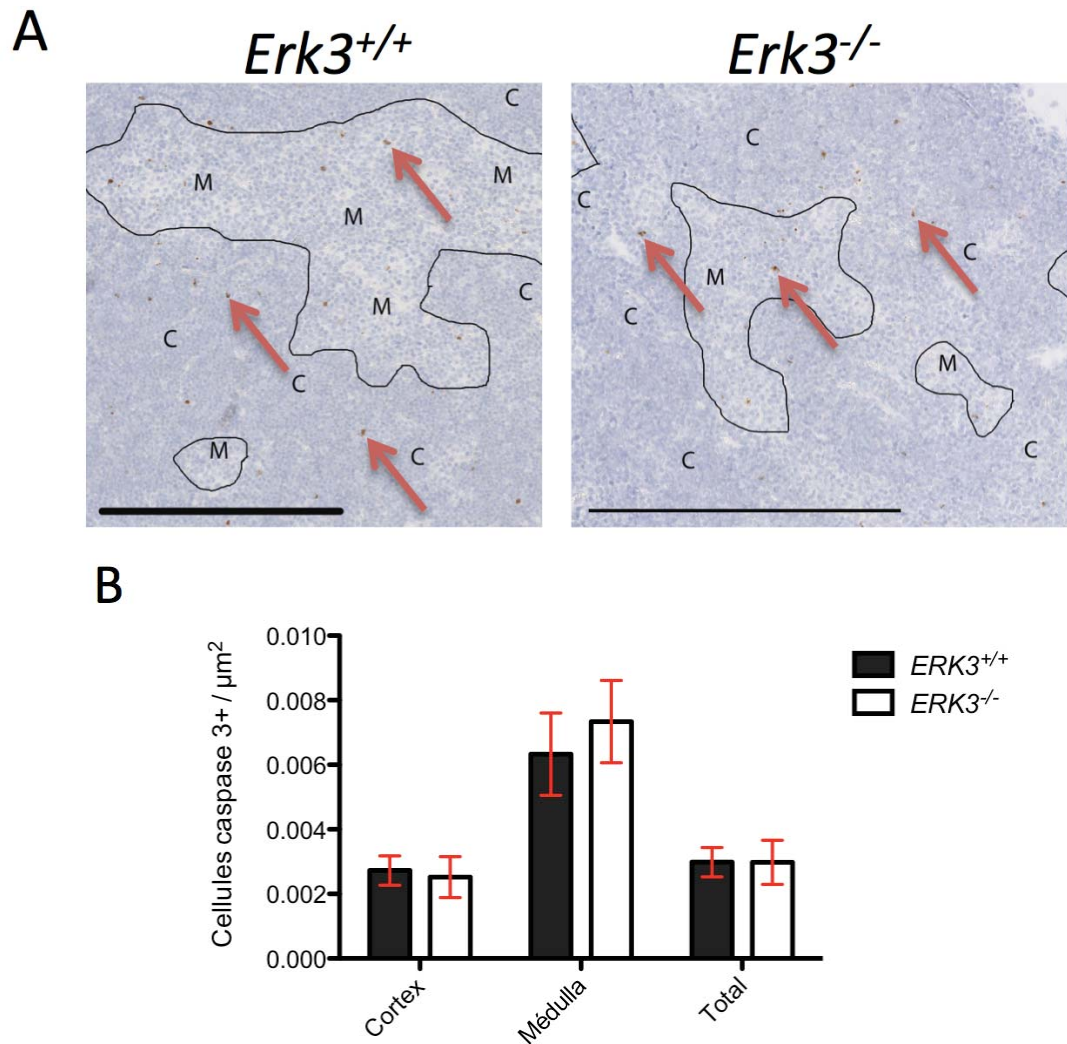


Figure 18. Aucune différence en apoptose mesurée par immunohistochimie entre la souris E19 déficiente pour ERK3 et la souris de type sauvage. (A) Une coloration immunohistochimique a été effectuée sur des sections de thymus de 10 μm d'épaisseur sur des souris E19 *Erk3^{+/+}* (gauche) et *Erk3^{-/-}* (droite) pour observer les niveaux d'apoptose. Le grossissement est de 15 fois et la ligne épaisse représente 800 μm . La médulla est indiquée par la lettre « M » (partie moins dense) et le cortex est indiqué par la lettre « C » (partie plus dense). Les flèches rouges indiquent les cellules qui sont caspase-3⁺. Les photos ont été prises avec le logiciel NPD.view de Hamamatsu. **(B)** Compilation des données selon les sections du thymus. L'aire de chaque partie du thymus (cortex et médulla) a été mesurée. Ensuite, les cellules caspase-3⁺ (en brun) ont été comptées par trois personnes de manière indépendante sans qu'elles connaissent les génotypes. Finalement, le nombre de cellules comptées a été rapporté à l'aire du thymus pour corriger l'effet de grosseur chez la souris *Erk3^{-/-}*. La taille du thymus est significativement plus petite chez la souris *Erk3^{-/-}*. Les rapports pour le thymus total, le cortex et la médulla sont montrés en histogramme pour les souris *Erk3^{+/+}* (barre noire) et *Erk3^{-/-}* (barre blanche). Les barres rouges représentent l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.). Représentatif de 4 souris *Erk3^{+/+}* et de 4 souris *Erk3^{-/-}*.

Finalement, nous avons mesuré l'apoptose d'une troisième façon. Nous avons décidé de mettre des thymocytes *ex vivo* en culture pour regarder le taux d'apoptose au cours du temps. Des thymocytes *ex vivo* ont été récoltés et ensuite mis en culture pour 3 ou 24 heures dans du milieu contenant 2% de FBS. Nous avons tenté de laisser les cellules plus longtemps en culture (48 heures). Toutefois, le pourcentage de survie des thymocytes de type sauvage et mutants était presque nul. Nous avons donc, opté pour un temps d'incubation maximal de 24 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées afin d'évaluer leur viabilité à l'aide d'un marquage 7-AAD et Annexin-V suivis d'une analyse par cytométrie.

Grâce aux marqueurs 7-AAD et Annexin-V, nous pouvons identifier trois populations distinctes. Les cellules 7-AAD⁻ et Annexin-V⁻ sont les cellules qui sont encore en vie, les cellules qui sont 7-AAD⁻ et Annexin-V⁺ sont dans la phase précoce de l'apoptose et les cellules qui sont 7-AAD⁺ et Annexin-V⁺ sont en nécrose. Au temps 0, nous remarquons un pourcentage plus faible des cellules vivantes chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} (Figure 19A). Cependant, au cours du temps, nous pouvons observer que le taux de viabilité cellulaire diminue de façon identique (Figure 19B, panneau de gauche) chez les KO et les WT. Par la suite, nous avons mesuré la cinétique d'apoptose des thymocytes DP. Nous pouvons remarquer que le taux d'apoptose augmente un peu plus vite chez les souris *Erk3*^{-/-} (2,81% à 4,96% à 13,3 %) que chez le type sauvage (2,62% à 4,1% à 11,1%). De plus, nous observons une augmentation de la nécrose des thymocytes DP *Erk3*^{-/-} comparativement aux thymocytes DP de type sauvage (Figure 19B, panneau de droite), mais qu'après 24 heures de culture, les niveaux de nécrose deviennent semblables. Il semblerait donc qu'il y a une petite augmentation de l'apoptose chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}. Cependant, ces analyses restent à être confirmées, puisque cette expérience n'a été faite qu'une seule fois. La conclusion pour cette partie est que nous sommes incapable d'observer une augmentation significative de l'apoptose chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} par rapport aux thymocytes de type sauvage.

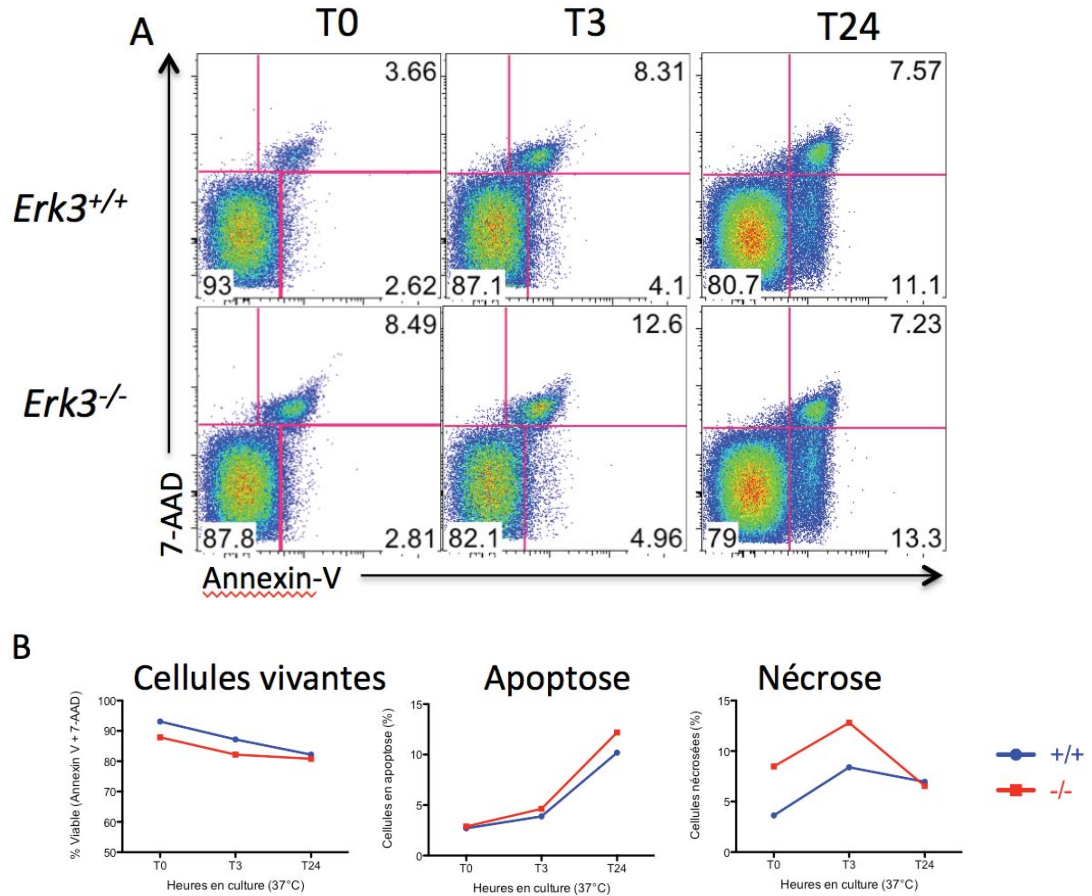


Figure 19. Légère augmentation de l'apoptose chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} après 24 heures en culture. (A) Profils de cytométrie en flux représentant les des marqueurs d'apoptose et de nécrose chez les thymocytes DP après différents temps d'incubation. Les profils 7-AAD/Annexin-V sont montrés pour les souris E19 *Erk3*^{+/+} (les panneaux du haut) et les souris E19 *Erk3*^{-/-} (les panneaux du bas). Différents temps d'incubation (0 heure, 3 heures et 24 heures à 37°C) sont également montrés. Les différentes populations (Nécrose : 7-AAD⁺-Annexin-V⁺, Apoptose : 7-AAD⁻-Annexin-V⁺, Cellules vivantes : 7-AAD⁻-Annexin-V⁻) sont indiquées sur les profils thymiques à proximité de leur pourcentage respectif. (B) Compilation des pourcentages de cellules vivantes, cellules en apoptose et cellules nécrosées chez les thymocytes DP après différents temps d'incubation. À gauche, les cellules vivantes sont montrées en graphique. Au centre, les cellules en apoptose sont montrées en graphique. À droite, les cellules nécrosées sont montrées en graphique. La ligne bleue représente les souris *Erk3*^{+/+} et la ligne rouge représente les souris *Erk3*^{-/-}. Représentatif d'une expérience (1 souris *Erk3*^{+/+} et 1 souris *Erk3*^{-/-}).

3.1.3 Est-ce que la demi-vie des thymocytes DP *Erk3*^{-/-} est plus courte que chez les thymocytes de type sauvage ?

Puisque le niveau d'apoptose des thymocytes DP *Erk3*^{-/-} ne semblent pas être différent avec celui du type sauvage, il nous a fallu une nouvelle hypothèse pour déterminer la réduction massive des thymocytes DP *Erk3*^{-/-}. Une expérience préliminaire nous a aidé à poser l'hypothèse en cours. En effet, ma prédécesseur avait regardé l'incorporation de BrdU dans les femelles gestantes pour vérifier si le nombre réduit de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} des souris E18,5 était dû au fait qu'ils prolifèrent moins que ceux du type sauvages. Elle a remarqué que le BrdU s'incorpore plus chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}, suggérant la perte des thymocytes DP qui ne se divisent plus. Ensuite, elle a démontré l'accumulation du phospho-H2AX, un marqueur de bris double brin d'ADN, chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}. Donc, plus de phospho-H2AX égale plus de cassure de double brin d'ADN. Il a été suggéré que cette accumulation de bris double brin d'ADN était causé par l'enzyme RAG, importante pour le réarrangement du RCT, plus précisément de la chaîne α dans le cas des thymocytes DP. En éliminant la protéine RAG grâce à des souris RCT transgéniques, la restauration du nombre de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} (Annexe IV - Figure 38). Puisque le RCT est déjà réarrangé dans ce modèle de souris, le thymocytes DP a besoin de survivre moins longtemps pour poursuivre son développement au stade simple positif. Ceci nous a permis de poser une nouvelle hypothèse : Est-ce que la demi-vie des thymocytes DP *Erk3*^{-/-} est plus courte que chez les thymocytes de type sauvage ? De plus, si la demi-vie des thymocytes DP *Erk3*^{-/-} est plus courte, ceci suggère qu'il y a plus d'apoptose chez ces cellules, mais cette apoptose arriverait tellement vite qu'il serait très difficile à détecté. Donc, si les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} ont une demi-vie réduite, nous verrons moins de thymocytes DP au fur et à mesure que la souris vieillit. Malgré le fait que de nouvelles cellules se formeront, il reste tout de même difficile à prédire si le nombre de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} viendrait au même niveau que celui du type sauvage.

Avant mon arrivée au laboratoire, une expérience préliminaire suggérait que c'était le cas, puisqu'après une culture thymique de 6 jours au lieu de 5 jours, le nombre de thymocytes chutait dramatiquement en absence d'ERK3 (Miriam Marquis, résultats non-publiés). Les cultures FTOC sont un outil unique pour évaluer la demi-vie des DP puisqu'elles permettent d'étudier une unique vague de différenciation. Afin d'évaluer définitivement cette nouvelle hypothèse, nous avons répété les cultures FTOC en ajoutant une modification au protocole. Puisque le thymus des souris contient deux lobes, nous avons effectué des FTOC de 5 et 6 jours en utilisant la même souris, en prenant un lobe par temps d'incubation. Après 5 et 6 jours de culture, nous avons récolté les thymus afin d'analyser leur composition cellulaire. Lors de la récolte, nous avons observé que les lobes thymiques sont toujours plus petits pour les souris *Erk3*^{-/-} (données non-montrées). La figure 20A présente la compilation des résultats de cellularité totale du thymus des souris *Erk3*^{-/-} (points blancs) et des souris de type sauvage (points noirs) pour les jours 5 et 6. Nous remarquons que les thymocytes *Erk3*^{-/-} sont toujours en plus petit nombre par rapport au type sauvage. Après avoir compté, nous procédions au marquage CD4/CD8. Dans la Figure 20A, nous pouvons voir les profils de cytométrie de thymus pour les souris *Erk3*^{-/-} et le type sauvage. Après 5 jours de culture, l'analyse des différentes sous-populations de thymocytes nous permet d'observer que la population de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} est réduite en proportion et en nombre cellulaire par rapport au type sauvage (Figure 20B et C). Ceci est encore vrai pour la culture de 6 jours (Figure 20B et C, panneaux du bas). Nous observons toujours une diminution globale pour les souris *Erk3*^{-/-} déficientes, mais dans le cas des souris de type sauvage, nous nous attendions à obtenir le même nombre de thymocytes DP qu'avec une culture de 5 jours. Ici, c'est le contraire que nous voyons, le nombre de thymocytes DP WT diminue plus rapidement que les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} (Figure 20C, DP panneau du bas). Pour les autres sous-populations de thymocytes, nous remarquons une baisse en pourcentage et en nombre pour les thymocytes CD4SP et CD8SP *Erk3*^{-/-}. Finalement, les thymocytes DN *Erk3*^{-/-} sont plus élevés en pourcentage et en nombre que les thymocytes de type sauvage. Donc, les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} ne semble pas mourir plus rapidement entre les jours 5 et 6 de culture par rapport au type sauvage. De plus,

une augmentation du nombre de thymocytes DN *Erk3*^{-/-} nous semble indiquer qu'il y a possiblement un bloc à la transition DN à DP, mais qui n'augmente avec les jours de cultures.

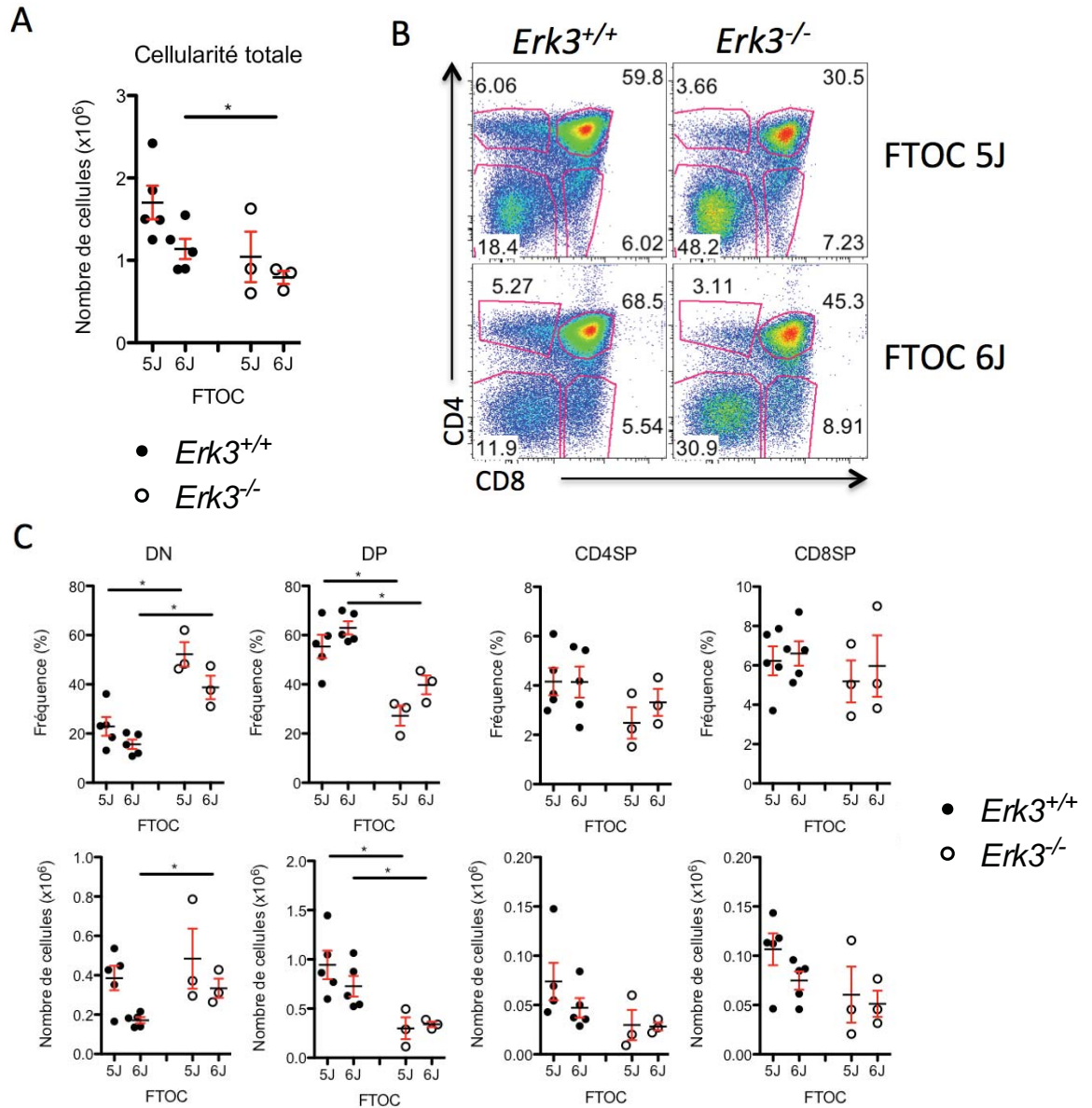


Figure 20. Aucune diminution accélérée du nombre de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} dans des cultures de thymus fœtaux de 6 jours. (A) Compilation de la cellularité totale des thymocytes *Erk3*^{-/-} déficients et de type sauvage. La cellularité totale thymique est montrée pour les souris *Erk3*^{-/-} et de type sauvage. Les points noirs représentent les souris *Erk3*^{+/+} et les points blancs représentent les souris *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (* : $p > 0,05$).

Chaque point représente une souris. **(B)** Profils de cytométrie en flux représentant des cultures de thymus fœtaux (FTOC) après 5 et 6 jours de culture, en utilisant un lobe thymique de la souris pour chaque jour d'incubation. Les profils CD4/CD8 sont montrés pour les souris *Erk3*^{+/+} (panneaux de gauche) et les souris *Erk3*^{-/-} (panneaux de droite). Différents temps d'incubation (5 jours (panneaux du haut) et 6 jours (panneaux du bas)) sont également montrés. Le pourcentage des différentes populations du thymus est indiqué sur les profils thymiques à proximité de leur population respective. **(C)** Pourcentage et nombre de cellules réduit pour les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} dans des FTOC de 5 jours et de 6 jours. La compilation du pourcentage et du nombre de cellules pour les thymocytes DN, DP, CD4SP et CD8SP est montrée. Les points noirs représentent les souris *Erk3*^{+/+} et les points blancs représentent les souris *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur (rouge et bleu) représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (* : p>0,05). Représentatif de 2 expériences indépendantes.

Par la suite, nous avons eu une autre idée pour mesurer la demi-vie des thymocytes DP. Les souris déficientes pour le récepteur ROR- γ t sont un bel exemple pour étudier le phénotype résultant d'une viabilité réduite chez les thymocytes. Chez des souris *Ror- γ t*^{-/-}, le nombre de thymocytes DP semble être affecté ¹⁴⁶. Les thymocytes *Ror- γ t*^{-/-} mûrent de façon inefficace en partie parce que le temps de leur survie est plus court au stade DP. En effet, ceci ne permet pas suffisamment de temps pour réarranger tout le répertoire disponible de la chaîne α du RCT. Normalement, les thymocytes DP subissent plusieurs réarrangements V α -J α du locus α du RCT dans le cas où la cellule ne produit pas de RCT utile. Pour les segments V α , les réarrangements se font à partir de la région 3' (V α 1) vers la région 5' (V α 80) et pour les segments J α , les réarrangements se déplacent de la région 5' (J α 61) vers la région 3' (J α 1) (Figure 8). Si le temps de survie des thymocytes est raccourci, comme chez la souris *Ror- γ t*^{-/-}, l'utilisation des segments les plus V α 5' et J α 3' est abrogée et la sélection positive est nettement réduite ¹⁹².

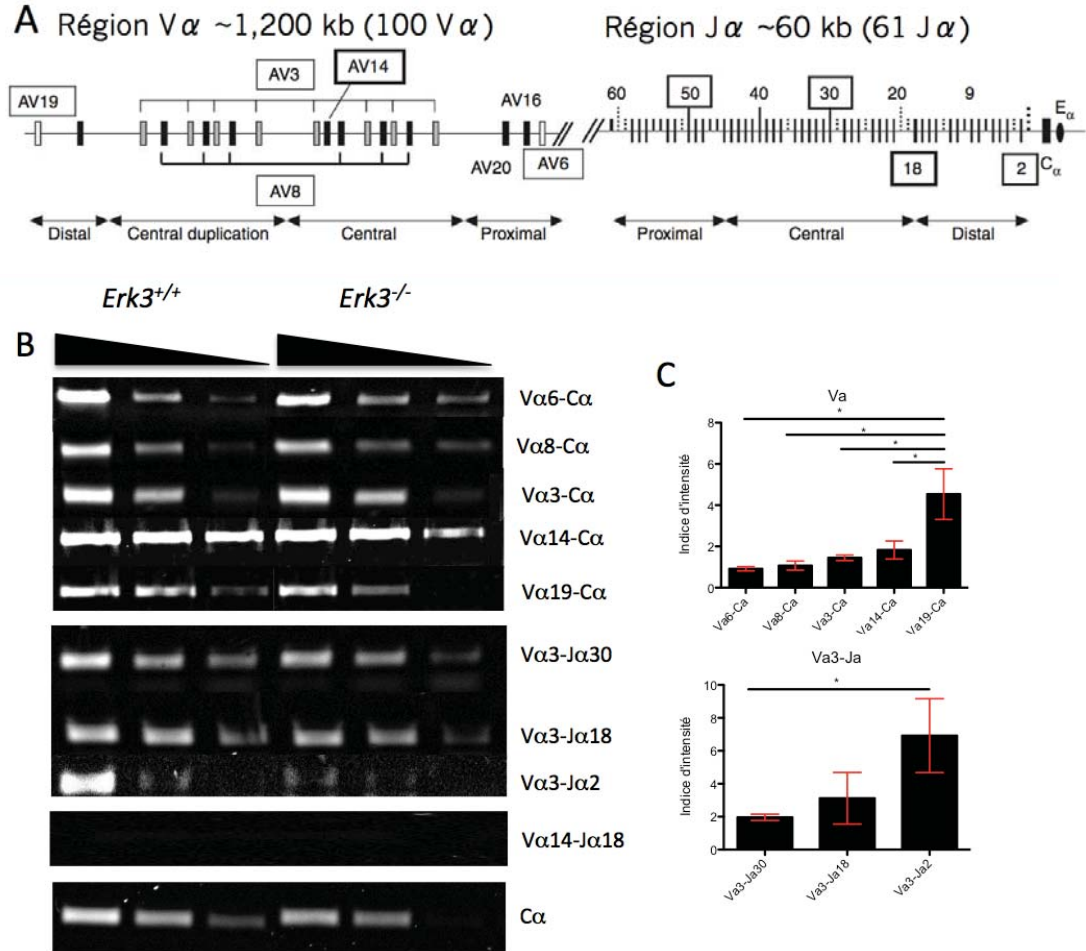


Figure 21. Diminution des réarrangements utilisant des régions V et J distaux chez les thymocytes *Erk3*^{-/-}. (A) Schéma des régions V α et J α sur le locus RCT α . Ce dessin inclut les segments V α (boîte incluant les nombres AV) et J α (boîte contenant les nombres) proximaux, centraux et distaux. Chaque ligne verticale représente un segment. (B) Les résultats de RT-PCR semi-quantitatif sur différents segments de réarrangements sont montrés pour la souris ERK3 WT (droite) et la souris ERK3 KO (gauche). Le panneau du haut représente l'utilisation de différents segments V α avec le C α . Les différentes paires sont organisées de la façon suivante : le segment V α le plus proximal est le V α 6 et le plus distal est le V α 19. Dans le second panneau, l'utilisation de différents segments J α est montrés avec un V α constant, le V α 3. Encore une fois, les paires sont organisées du plus proximales (V α 3-J α 30) vers le plus distale (V α 3-J α 2). Le troisième panneau est l'utilisation d'un segment V α distal et d'un segment J α distal (V α 14-J α 18). Le contrôle endogène est l'amplification de la région C α . La flèche représente la dilution de l'ADNc. (C) Compilation de la mesure de l'intensité des bandes de PCR semi-quantitatif. L'intensité des bandes de PCR semi-quantitative a été mesurée par le logiciel ImageJ. Par la suite, l'intensité de chaque paire a été comparée au contrôle C α . Finalement, nous avons fait un rapport WT/KO des résultats précédents, nommé indice d'intensité sur le graphique. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.) sont représentées pour chaque paire d'amorce. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide de l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) et du post-test de Bonferroni (* : $p > 0,05$). Représentatif de 3 expériences indépendantes.

Nous avons donc évalué les réarrangements distaux en utilisant différentes paires d'amorce situées dans le locus α du RCT. La figure 21A nous indique l'emplacement des différentes amorces sur le locus α . Nous avons choisi nos amorces dans tous les segments (proximaux à distaux) pour les régions $V\alpha$ et $J\alpha$. La région $C\alpha$ est située complètement à l'extrémité droite du dessin. Nous avons décidé de choisir les segments suivant : $V\alpha 6$ (Proximal), $V\alpha 8$, $V\alpha 3$, $V\alpha 14$, $J\alpha 30$, $J\alpha 18$ (central) et $V\alpha 19$ et $J\alpha 2$ (distal). Dans la figure 21B, nous pouvons voir l'amplification de l'ADNc pour chaque paire d'amorces testées. Dans le panneau du haut (les paires d'amorces comportant des régions $V\alpha$ variables uniquement), nous observons chez les thymocytes *Erk3*^{-/-} une diminution de l'intensité des bandes lorsque les régions $V\alpha$ plus distales ($V\alpha 6$ - $C\alpha$ versus $V\alpha 19$ - $C\alpha$) sont amplifiées. De plus, lorsque nous prenons la région $J\alpha$ (Figure 21B, 2^e panneau, les paires d'amorces comportant des régions $J\alpha$ variables uniquement) nous observons la même chose, plus on se dirige vers un réarrangement distal ($V\alpha 3$ - $J\alpha 2$), moins les bandes sont intenses chez les thymocytes *Erk3*^{-/-}. Étrangement, nous n'observons aucune bande pour la paire d'amorces $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ (Figure 21B, 3^e panneau). Nous pouvons aussi constater, que chez la souris *Erk3*^{-/-}, il y a moins de transcription de la chaîne α du RCT (amplification $C\alpha$) que chez la souris de type sauvage (Figure 21B). Ce résultat était attendu puisqu'il y a moins de thymocytes DP qui expriment le RCT chez la souris *Erk3*^{-/-}. Nous avons donc corrigé les données pour cet effet dans nos compilations. L'indice d'intensité est représenté de la façon suivante. Premièrement, nous avons rapporté l'intensité des bandes de chaque paire d'amorce à notre contrôle endogène, le segment $C\alpha$, puisque ce segment mesure la quantité de RCT transcrit dans la cellule. Ensuite, nous avons fait un rapport WT/KO avec les résultats précédents pour voir s'il y a un effet entre les WT et les KO (les valeurs sont représentées par l'indice d'intensité). Donc, plus l'indice d'intensité est grand, plus l'intensité de la bande WT est grande comparé à celle du KO pour une combinaison d'amorce. La compilation présentée dans la figure 21C démontre clairement qu'il y a une diminution des réarrangements utilisant les segments de gènes $V\alpha$ et $J\alpha$ distaux chez les thymocytes *Erk3*^{-/-}. Cette diminution suggère que les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} ont une demi-vie plus

courte puisqu'une survie prolongée est requise pour effectuer ces réarrangements ou tout simplement un défaut de réarrangement.

3.2 Pourquoi y a-t-il moins de thymocyte CD4SP chez la souris *Erk3*^{-/-}?

3.2.1 Est-ce qu'il y a un défaut de la sélection positive chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}?

Chez les souris *Erk3*^{-/-}, il y a aussi une diminution du pourcentage et du nombre de thymocytes CD4SP. Nous nous sommes donc attardés à mieux comprendre ce défaut de différenciation. La formation des thymocytes CD4SP est la résultante de la sélection positive des thymocytes DP et du choix de différenciation vers la lignée CD4SP. La sélection positive est nécessaire afin de s'assurer que le RCT exprimé par la cellule T est restreinte aux molécules du CMH du soi. Pour être sélectionnés positivement, les thymocytes DP doivent recevoir les signaux nécessaires via son RCT. Un signal trop faible ou absent induira éventuellement la mort de la cellule et un signal trop fort va induire la sélection négative, un processus qui élimine les cellules auto-réactives. Cependant, si le signal est ni trop fort ni trop faible, la cellule passe ce qu'on appelle la sélection positive et peut se diriger vers le stade de transition entre les thymocytes DP et les thymocytes SP. Ensuite, les cellules passeront au stade CD4SP ou CD8SP, dépendant de la spécificité de leur RCT pour les molécules du CMH. Donc, nous posons l'hypothèse que le nombre réduit de thymocytes CD4SP résulte à l'incapacité des thymocytes DP à subir la sélection positive.

L'utilisation de modèle de souris transgéniques a grandement fait avancer les études portant sur la sélection thymique. Cependant, un grand problème est survenu pour ces modèles. Le fait de posséder un transgène pour le RCT accélère le processus de

développement thymique. En effet, le RCT est déjà complètement formé au stade DN2, contrairement au stade DP pour les souris non-transgéniques (Figure 22).

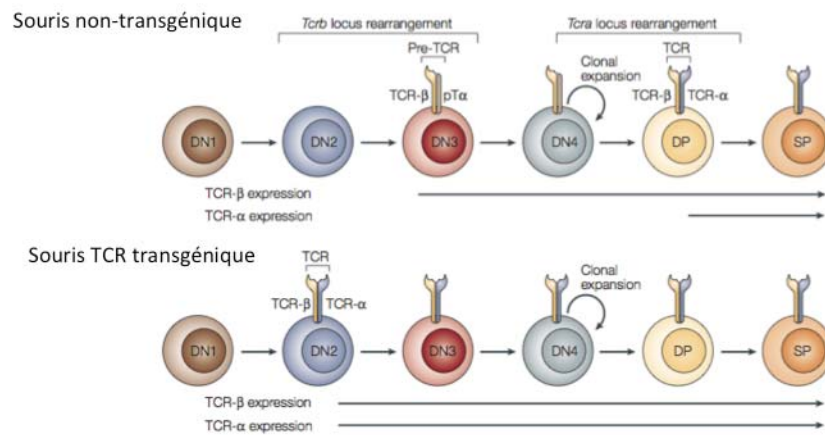


Figure 22. Les souris RCT transgénique expriment un RCT très tôt dans leur développement. Tiré de ¹⁷².

Afin d'évaluer la sélection positive, le modèle que nous avons utilisé est la souris transgénique pour un RCT. En effet, l'utilisation de souris RCT transgénique simplifie les processus de sélection (positive et négative), car les thymocytes de ces souris possèdent uniquement un RCT à leur surface. Ce transgène force donc, les processus de sélection. Nous avons décidé d'utiliser deux modèles de souris transgéniques, OT-I et OT-II, restreint respectivement au CMH de classe I et II. Ces souris transgéniques ont été croisées avec des souris ERK3 hétérozygotes. Ensuite, nous avons recroisé ces souris entre-elles afin d'obtenir nos souris de travail, OT-I ou OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-I ou OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Au départ, nous voulons voir le phénotype du thymus des souris. Nous avons donc, prélevé des thymus de souris E19 OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} (Figure 23). L'analyse des profils CD4/CD8 de thymus de ces souris révèle qu'il n'y a aucune différence entre le pourcentage et le nombre de thymocytes DP chez la souris *Erk3*^{-/-} et de type sauvage (Figure 23A et 23C, panneaux DP). Par contre, nous observons une réduction significative du nombre de thymocytes TDS et CD4SP OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Finalement, il n'y a aucune différence au niveau de la cellularité thymique totale entre les thymus OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et les thymus OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} (Figure 23B). Ces résultats suggèrent un défaut de sélection positive en absence de ERK3.

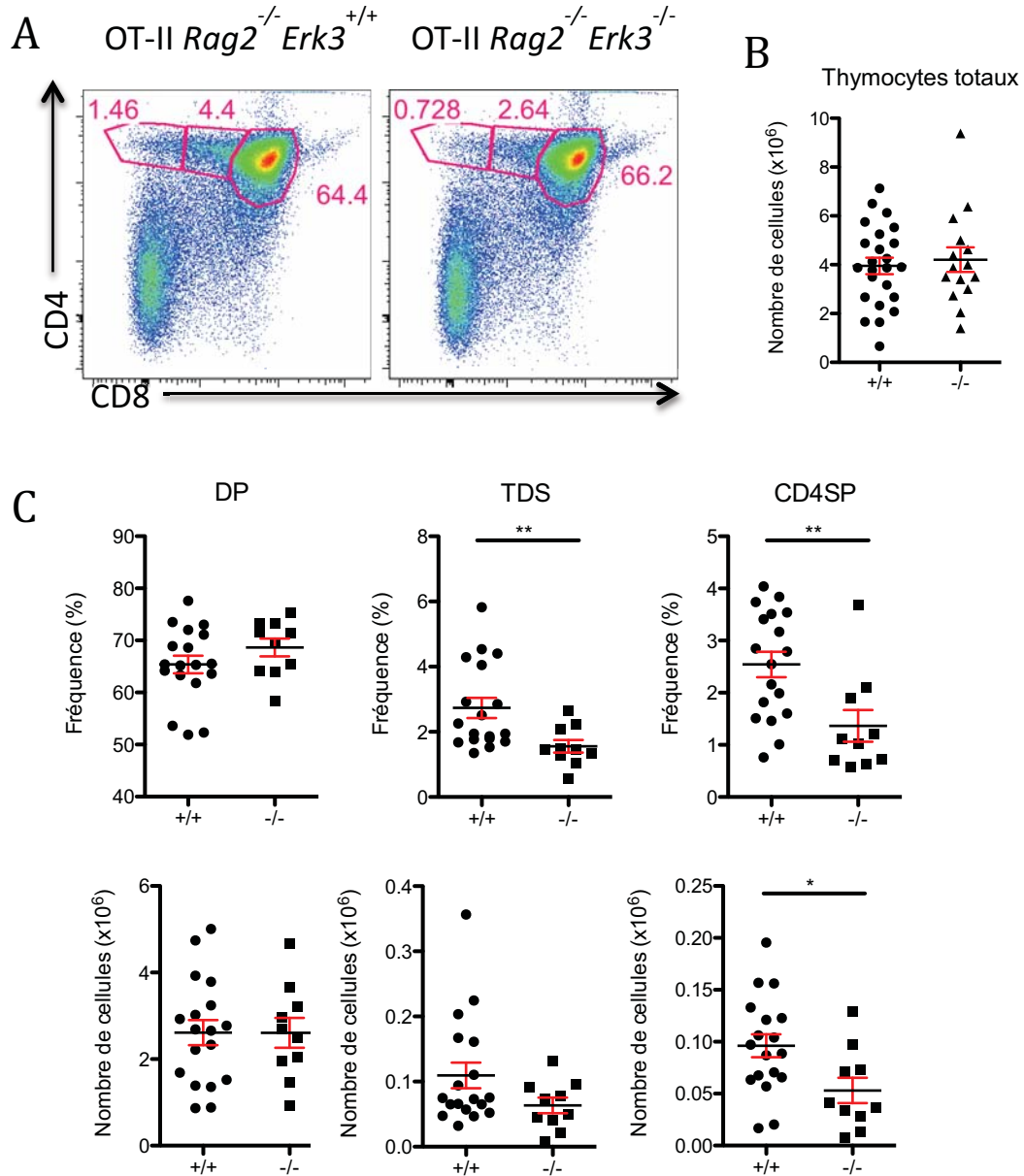


Figure 23. Diminution du nombre de thymocytes TDS et thymocytes CD4SP chez la souris E19 OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} (A) Les profils CD4/CD8 de cytométrie en flux sont montrés pour les souris OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Le pourcentage des différentes populations de thymocytes est inscrit à proximité de leur population respective. Représentatif de 6 expériences indépendantes. (B) Nombre équivalent de thymocytes totaux chez la souris E19 OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} et *Erk3*^{+/+}. La cellularité totale est montrée pour les souris OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. (C) Pourcentage et nombre cellulaire pour les différentes populations de thymocytes. La cellularité (panneaux du bas) et le pourcentage (panneaux du haut) des thymocytes DP, TDS et CD8SP sont montrés pour les souris E19 OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} et *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de

la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (* : $p > 0,05$; ** : $p > 0,01$).

Pour étudier la sélection positive chez les souris *Erk3*^{-/-} RCT transgénique, nous avons vérifié les populations de thymocytes DP, TDS et CD4SP qui sont RCT^{fort}CD69^{fort} (Figure 24A). Suite à la sélection positive, le niveau d'expression des molécules RCT et CD69 est augmenté. Nous observons qu'il y a une réduction significative de cellules qui sont RCT^{fort}CD69^{fort} chez les thymocytes DP, TDS et CD4SP provenant d'une souris *Erk3*^{-/-}, nous indiquant qu'il y a effectivement un défaut de la sélection positive (Figure 24A). La compilation des résultats (Figure 24C), confirme que cette baisse est significative pour le pourcentage de thymocytes DP, TDS et CD4SP *Erk3*^{-/-}. Nous voyons également une réduction des nombres de thymocytes DP, TDS et CD4SP en absence de ERK3. Cependant, seulement les nombres de thymocytes TDS et CD4SP sont réduits de façon significative (Figure 24). Ces résultats suggèrent un défaut de la sélection positive. Afin de valider ces résultats, nous avons évalué l'expression d'un autre marqueur (CD5) dont l'expression augmente suite à la sélection positive.

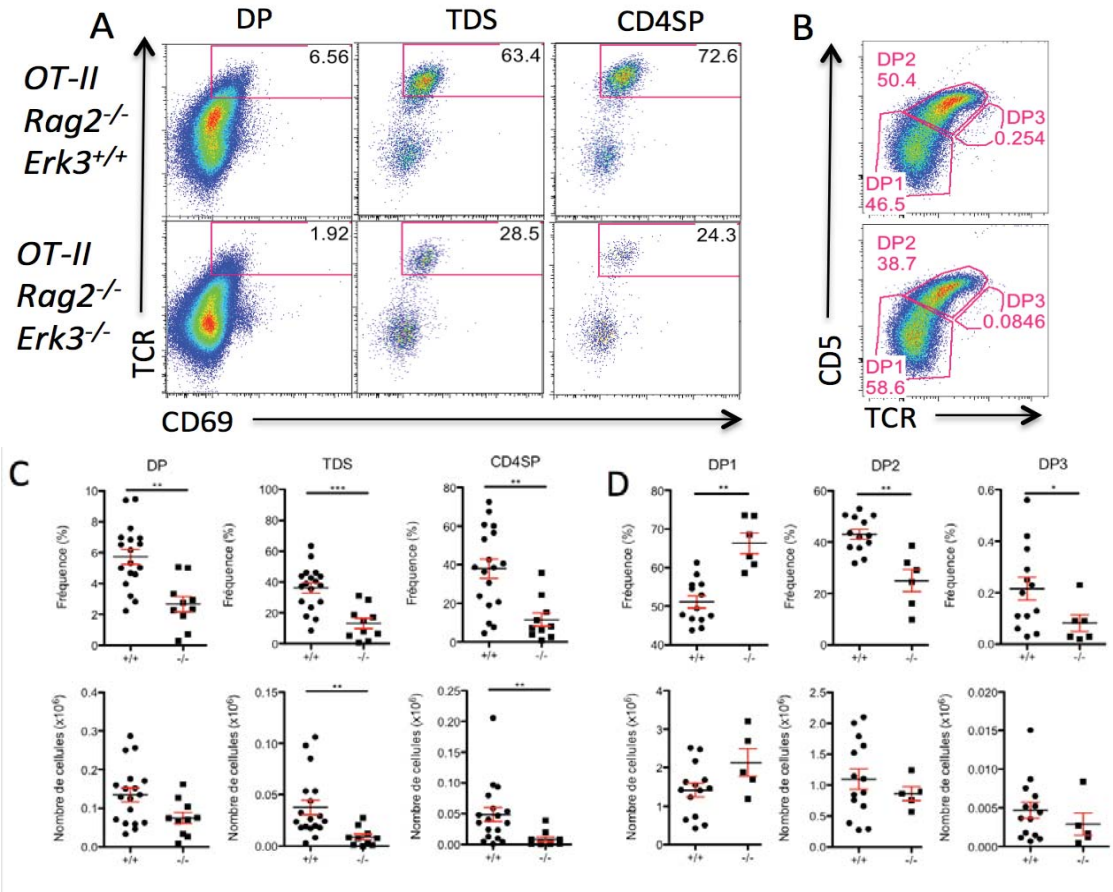


Figure 24. Défaut de la sélection positive chez la souris transgénique OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} déficiente. (A) Les profils RCT/CD69 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes DP, TDS et CD4SP pour les souris OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. La population de thymocytes sélectionnée positivement (RCT^{fort}CD69^{fort}) qui est encadrée et le pourcentage de cette population sont inscrits dans l'encadré. (B) Les profils RCT/CD5 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes DP pour les souris OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Les trois populations distinctes sont nommées DP1 (RCT^{faible}CD5^{faible}), DP2 (RCT^{int}CD5^{fort}) et DP3 (RCT^{fort}CD5^{int}). Les pourcentages sont inscrits à proximité de leur population respective. (C) Compilation montrant une réduction de nombre de cellules RCT^{fort}CD69^{fort} chez les thymocytes DP, TDS et CD4SP pour les souris OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Les pourcentages sont montrés dans les panneaux du haut et les nombres cellulaires sont montrés dans les panneaux du bas pour les thymocytes DP, TDS et CD4SP pour les souris OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (** : p>0,01, *** : p>0,001). (D) Compilation montrant une accumulation de cellules au stade DP1 chez la souris OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Les pourcentages sont montrés dans les panneaux du haut et les nombres cellulaires sont montrés dans les panneaux du bas pour les thymocytes DP1, DP2 et DP3 pour les souris OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (* : p>0,05, ** : p>0,01). Représentatif de 5 expériences indépendantes.

Une étude récente dans la revue *Science Signaling* a démontré que les thymocytes DP peuvent être divisée en plusieurs sous populations en utilisant les marqueur RCT et CD5¹⁶². En effet, trois populations de DP, soit les DP1 (RCT^{faible}CD5^{faible}), DP2 (RCT^{int}CD5^{fort}) et DP3 (RCT^{fort}CD5^{int}), peuvent être identifiés. Les thymocytes DP ayant un haut niveau de RCT et CD5 sont considérés comme des thymocytes post-sélection, c'est-à-dire qu'ils ont passé la sélection positive. De plus, cette étude a démontré que l'apparition des thymocytes CD4SP et CD8SP n'arrivent pas en même temps lors du développement thymique. Il semblerait que les thymocytes CD4SP proviennent directement de la sous-population DP2. Tandis que les thymocytes CD8SP requiert de passer par l'étape DP3¹⁶².

Dans la figure 24, nous avons analysé les sous populations DP1, DP2 et DP3 à l'aide des marqueurs RCT et CD5. Premièrement, nous remarquons l'absence totale des thymocytes DP3 autant chez la souris *Erk3*^{+/+} que *Erk3*^{-/-}. Selon les observations du groupe de Seddon¹⁶², l'absence de DP3 est normal dans un modèle de souris RCT transgénique CMHII restreint, puisque les thymocytes CD4SP dérivent de la population de DP2 sans passer par le stade DP3. Dans la figure 24B, nous observons un défaut de la transition DP1 à DP2. La compilation des données confirme ce résultat (Figure 24D). Le pourcentage des thymocytes DP1 *Erk3*^{-/-} est significativement plus élevé que le type sauvage, ce qui fait réduire, également de façon significative, le pourcentage des thymocytes DP2 et DP3 (Figure 24D). Les nombres cellulaires démontrent également la même tendance, toutefois, aucune des réduction observées est significative (Figure 24D). En conclusion, nous voyons un défaut de la sélection positive chez le modèle de souris RCT transgéniques OT-II *Erk3*^{-/-}.

Par la suite, nous avons refait les mêmes analyses dans le modèle transgénique OT-I, qui est restreint au CMH de classe I. Dans les profils CD4/CD8 de thymus de la figure 25A, nous pouvons tout de suite remarquer qu'il n'y a pas de thymocytes CD4SP, puisque nous sommes dans un modèle de souris OT-I. Nous notons une accumulation des thymocytes DP chez les souris OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} (Figure 25 ; 75,7% pour le KO et 32,3% pour le WT). Cette augmentation est significative autant en pourcentage qu'en nombre cellulaire (Figure 25C).

De plus, nous pouvons constater une réduction significative en pourcentage et en nombre cellulaire des thymocytes TDS et CD8SP. Il est important de mentionner ici que c'est la première fois que les thymocytes CD8SP sont observés, puisque dans un modèle de souris non-transgénique, le développement des thymocytes CD8SP apparaît généralement de 1 à 2 jours après la naissance. Toutefois, puisque nous utilisons un modèle de souris RCT transgénique, l'apparition des CD8SP est accélérée et il est possible d'analyser des CD8SP sur des souris E19. Au départ, nous pensons que ce sont uniquement les thymocytes CD4SP qui sont affectés par une déficience en ERK3. Avec ses nouveaux résultats, une déficience en ERK3 affecterait plus précisément la transition entre les thymocytes DP et SP. Cependant, est-ce que cette accumulation de thymocytes DP et la diminution de thymocytes TDS et CD8SP OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} sont la résultante d'un défaut de la sélection positive ? Nous le verrons un peu plus loin dans cette section. Finalement, tout comme ma prédécesseur, nous n'observons aucune différence au niveau de la cellularité thymique totale entre les thymocytes OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et les thymocytes OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} (Figure 25B).

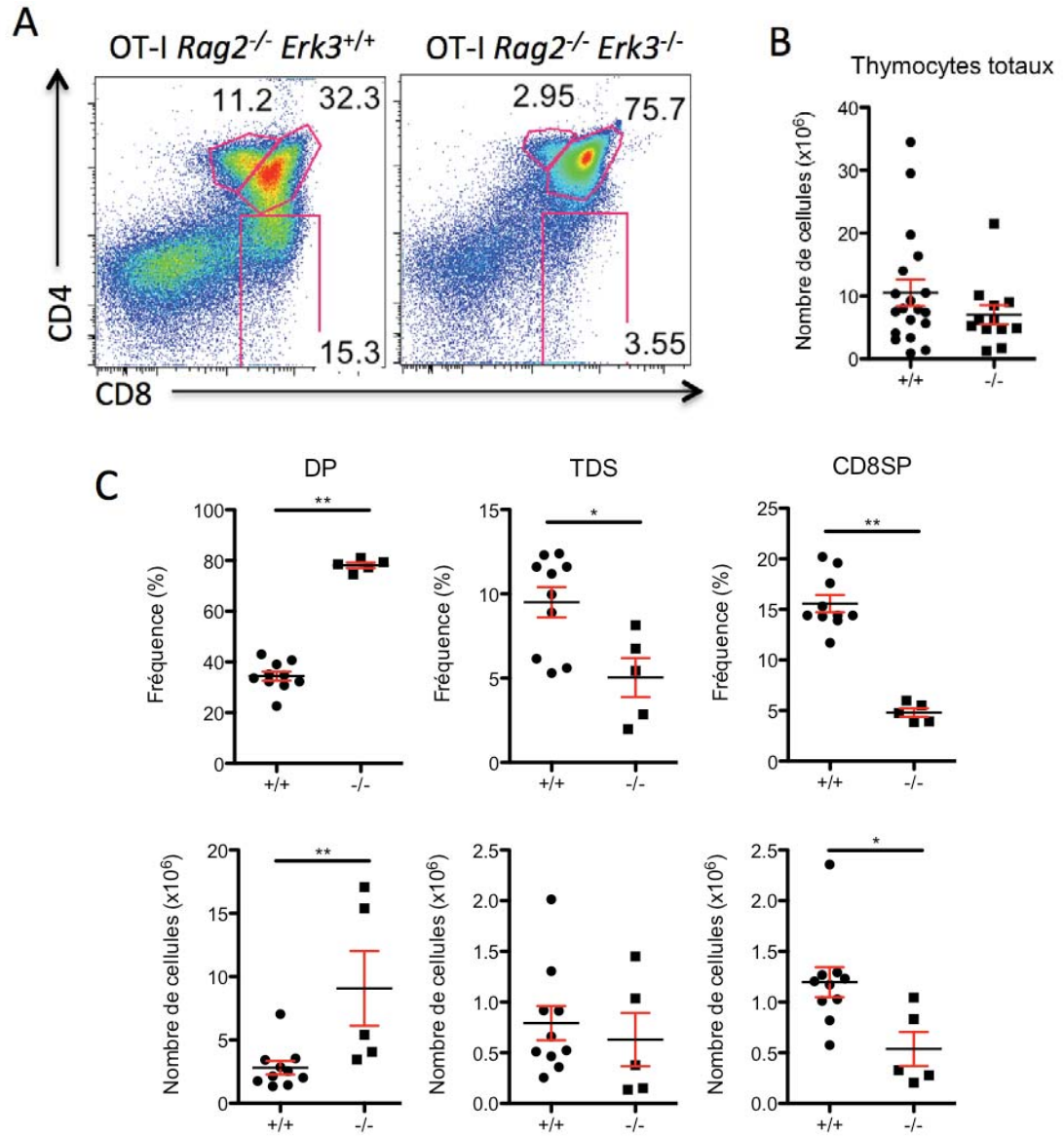


Figure 25. Plus de thymocytes DP et moins de thymocytes TDS et thymocytes CD8SP chez la souris E19 OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} (A) Les profils CD4/CD8 de cytométrie en flux sont montrés pour les souris OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Le pourcentage des différentes populations de thymocytes est inscrit à proximité de leur population respective. Représentatif de 5 expériences indépendantes. (B) Nombre équivalent de thymocytes totaux chez la souris E19 OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} et *Erk3*^{+/+}. La cellularité totale est montrée pour les souris OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. (C) Pourcentage et nombre cellulaire pour les différentes populations de thymocytes. La cellularité (panneaux du bas) et le pourcentage (panneaux du haut) des thymocytes DP, TDS et CD8SP sont montrés pour les souris E19 OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} et *Erk3*^{+/+}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (* : p>0,05 ; ** : p>0,01).

Nous avons fait les mêmes analyses d'expression du RCT et de CD69 chez la souris transgénique OT-I *Rag2^{-/-} Erk3^{-/-}*, afin d'évaluer si la sélection positive est défectueuse dans ce modèle. Comme dans le modèle OT-II, nous observons une diminution des cellules RCT^{fort}CD69^{fort} chez les thymocytes DP, TDS et CD8SP chez la souris *Erk3^{-/-}* (Figure 26A).

En compilant les résultats (Figure 26C), nous observons une réduction significative du pourcentage de cellules RCT^{fort}CD69^{fort} chez les thymocytes DP, TDS et CD8SP. De plus, nous observons une réduction du nombre de cellules pour toutes ces populations. Toutefois, uniquement la réduction du nombre de CD8SP est significative (Figure 26C). Par la suite, nous avons analysé les sous-populations de thymocytes DP1, DP2 et DP3 dans ce modèle à l'aide des marqueurs RCT et CD5.

Dans la Figure 26B, nous pouvons observer les trois sous-populations de thymocytes DP chez la souris de type sauvage. Toutefois, la population de DP3 est presque totalement abolie chez la souris *Erk3^{-/-}* (Figure 26B, panneau du bas). En effet, il semble avoir un arrêt au niveau de la transition de la sous-population DP1-DP2. En compilant les résultats (Figure 26D), nous pouvons clairement voir une accumulation significative du pourcentage et du nombre de cellules au stade DP1 chez la souris *Erk3^{-/-}* (Figure 26D, panneaux DP1). Ce blocage de la différenciation semble affecter les thymocytes DP2 et DP3, car le pourcentage et les nombres cellulaires sont réduits de façon significative chez la souris *Erk3^{-/-}*. Si un thymocyte DP reçoit le signal de sélection positive, les niveaux d'expression du RCT et du CD5 augmentent. Toutefois, les niveaux d'expression du RCT et de CD5 semblent rester faible (Figure 26D). En conclusion, nous voyons un défaut de la sélection positive chez deux modèles de souris RCT transgéniques *Erk3^{-/-}*.

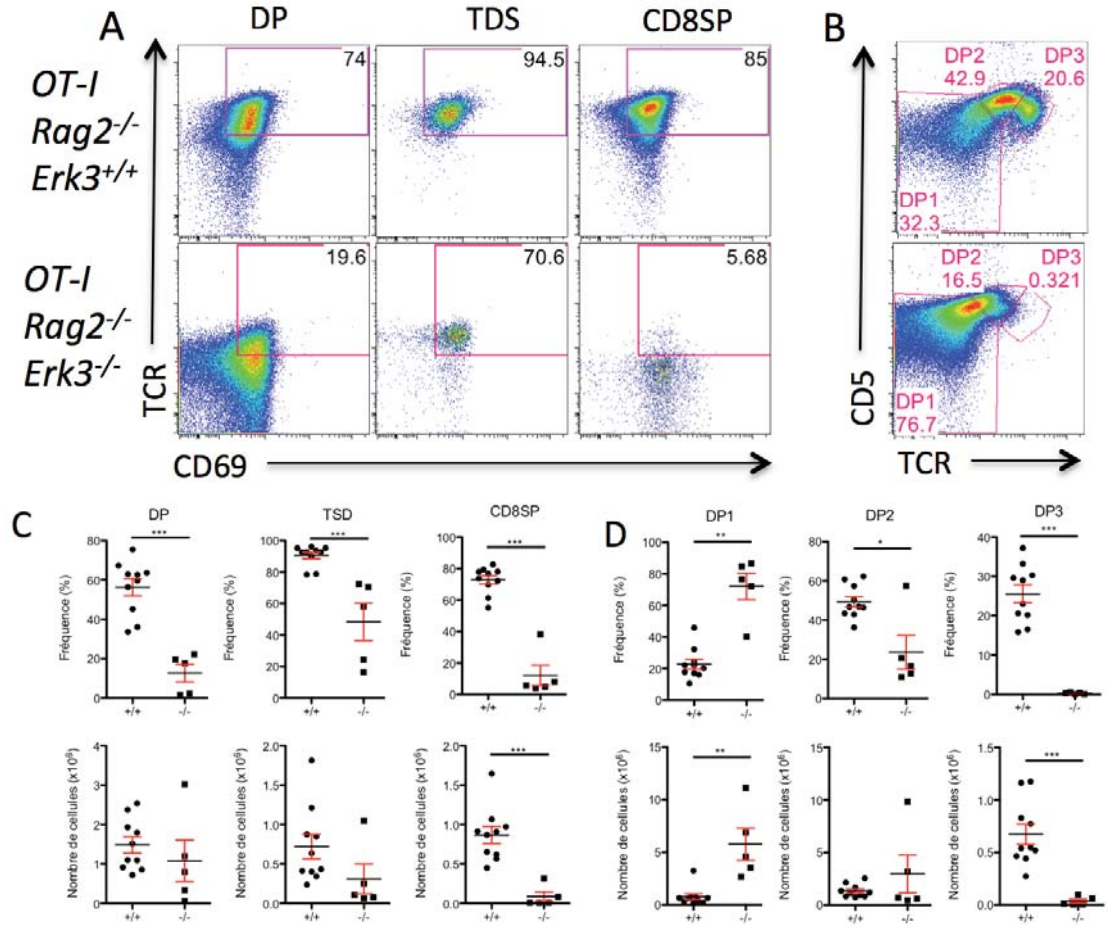


Figure 26. Défaut de la sélection positive chez la souris transgénique OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. (A) Les profils RCT/CD69 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes DP, TDS et CD8SP pour les souris OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. La population de thymocytes sélectionnée positivement (RCT^{fort}CD69^{fort}) qui est encadrée et le pourcentage de cette population sont inscrits dans l'encadré. (B) Les profils RCT/CD5 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes DP pour les souris OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Les trois populations distinctes sont nommées DP1 (RCT^{faible}CD5^{faible}), DP2 (RCT^{int}CD5^{int}) et DP3 (RCT^{fort}CD5^{fort}). Les pourcentages sont inscrits à proximité de leur population respective. (C) Compilation montrant une réduction de nombre de cellules RCT^{fort}CD69^{fort} chez les thymocytes DP, TDS et CD8SP pour les souris OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Les pourcentages sont montrés dans les panneaux du haut et les nombres cellulaires sont montrés dans les panneaux du bas pour les thymocytes DP, TDS et CD8SP pour les souris OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (*** : p>0,001). (D) Compilation montrant une accumulation de cellules au stade DP1 chez la souris OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Les pourcentages sont montrés dans les panneaux du haut et les nombres cellulaires sont montrés dans les panneaux du bas pour les thymocytes DP1, DP2 et DP3 pour les souris OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} et OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide

du test de Mann-Whitney (* : $p > 0,05$, ** : $p > 0,01$, *** : $p > 0,001$). Représentatif de 6 expériences indépendantes.

Finalement, nous voulons savoir si nous étions capable de récapituler ce phénotype dans un modèle polyclonal. Nous avons donc fait les mêmes analyses chez la souris *Erk3*^{-/-} non transgénique pour un RCT. Dans la figure 27A, nous observons qu'il y a moins de cellules RCT^{fort}CD69^{fort} chez les thymocytes DP, TDS et CD4SP en absence de ERK3. La compilation nous indique clairement que la réduction en pourcentage et en nombre de cellules RCT^{fort}CD69^{fort} est significative (Figure 27C). L'analyse des sous-populations de DP (DP1 à DP3) a également été effectuée (Figure 27B). Même si les pourcentages des thymocytes DP2 et DP3 sont plus petits chez la souris non-transgénique pour le RCT, il est possible d'observer une légère accumulation significative de thymocytes DP1 chez les souris *Erk3*^{-/-} déficientes. Cette accumulation en DP1 joue sur les niveaux des thymocytes DP2 et DP3, qui sont eux réduit de façon significative, en pourcentage et en nombre cellulaire, chez la souris *Erk3*^{-/-} (Figure 27D). En conclusion, il y a définitivement un défaut de la sélection positive en absence de ERK3.

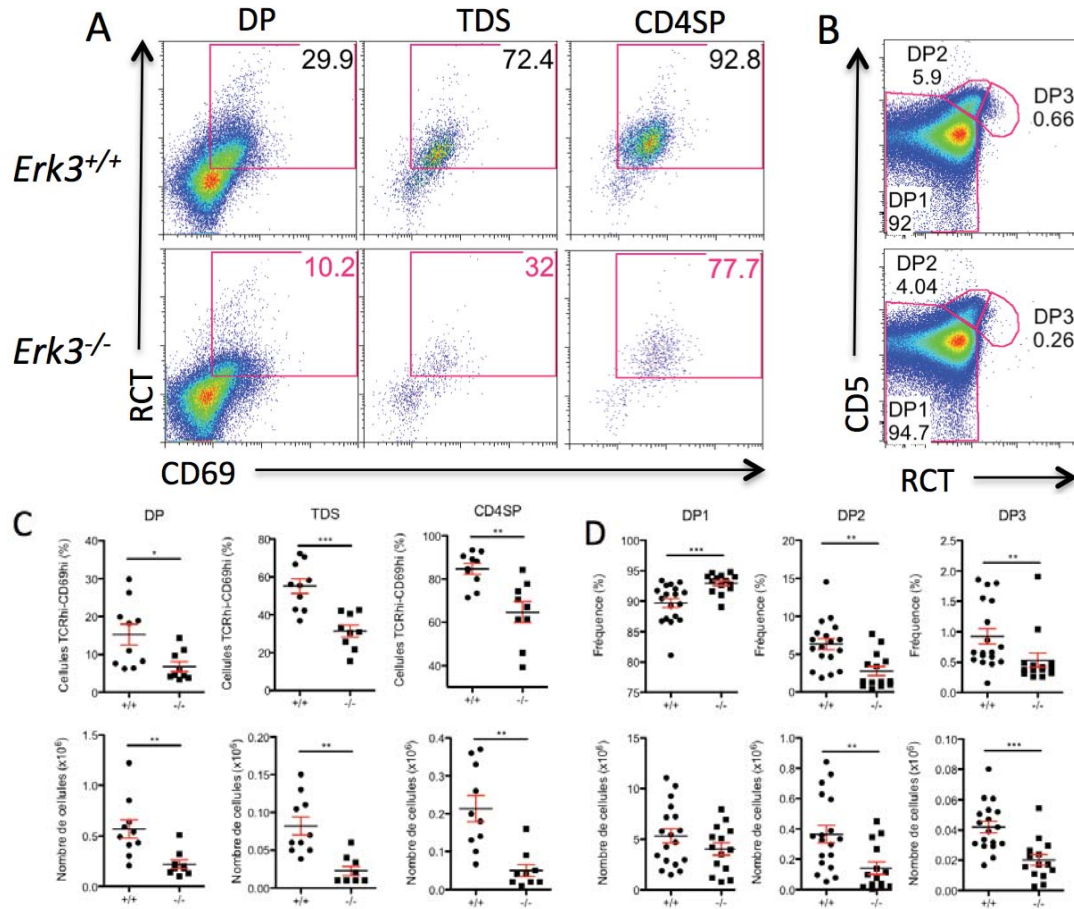


Figure 27. Défaut de la sélection positive chez la souris *Erk3*^{-/-} non transgénique pour un RCT. (A) Les profils RCT/CD69 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes DP, TDS et CD4SP pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. La population de thymocytes sélectionnée positivement qui (RCT^{fort}CD69^{fort}) est encadrée et le pourcentage de cette population sont inscrits dans l'encadré. (B) Les profils RCT/CD5 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes DP pour les souris *Erk3*^{+/+} *Erk3*^{-/-}. Les trois populations distinctes sont nommées DP1 (RCT^{faible}CD5^{faible}), DP2 (RCT^{int}CD5^{fort}) et DP3 (RCT^{fort}CD5^{int}). Les pourcentages sont inscrits à proximité de leur population respective. (C) Compilation montrant une réduction de nombre de cellules RCT^{fort}CD69^{fort} chez les thymocytes DP, TDS et CD4SP pour les souris *Erk3*^{-/-}. Les pourcentages sont montrés dans les panneaux du haut et les nombres cellulaires sont montrés dans les panneaux du bas pour les thymocytes DP, TDS et CD8SP pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (* : p>0,05, ** : p>0,01, *** : p>0,001). (D) Compilation montrant une accumulation de cellules au stade DP1 chez la souris *Erk3*^{-/-}. Les pourcentages sont montrés dans les panneaux du haut et les nombres cellulaires sont montrés dans les panneaux du bas pour les thymocytes DP1, DP2 et DP3 pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (** : p>0,01, *** : p>0,001). Représentatif de 6 expériences indépendantes.

Par la suite, nous voulions savoir ce qui arriverait si nous forçons la sélection positive par la mise en culture de thymocytes en présence d'anti-CD3 purifié. Nous avons donc pris des thymocytes de souris transgéniques, OT-I et OT-II, de souris *Erk3*^{-/-} et de type sauvage et nous les avons placés en culture pendant 24 heures en présence ou non de stimulation du RCT avec de l'anti-CD3. Des études précédentes ont démontré qu'une stimulation du RCT *in vitro* chez les thymocytes peut induire plusieurs aspects de la sélection positive^{193,194}. Pour notre étude, nous avons stimulé des thymocytes de souris transgénique OT-I (Figure 28) et OT-II (Figure 29) avec de l'anti-CD3 (10µg/mL).

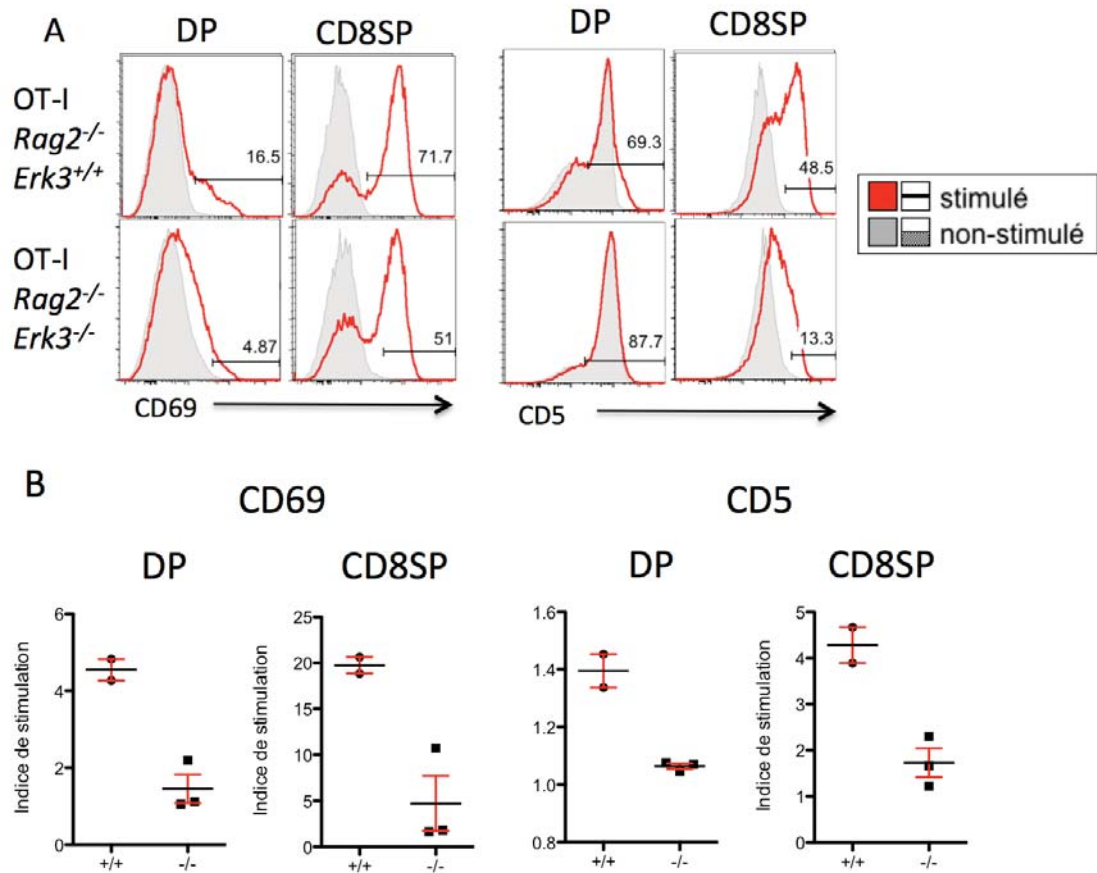


Figure 28. Défaut de l'augmentation de l'expression des molécules CD69 et CD5 chez les thymocytes DP et CD8SP OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} suite à une stimulation du RCT. (A) Des thymocytes totaux OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} ou *Erk3*^{-/-} ont été incubés 24 heures en présence (ligne rouge pleine) ou non (ligne grise remplie) de stimulation du RCT avec de l'anti-CD3. Les thymocytes DP et CD8SP viables (7-AAD⁻) sont présentés sous forme de courbe. Le pourcentage dans chaque figure représente le pourcentage de thymocytes DP ou CD8SP qui deviennent CD69^{fort} (4 panneaux de gauche) et CD5^{fort} (4 panneaux de droite). (B) Indice de stimulation des molécules de la sélection positive CD69 et CD5. Les indices de stimulation

(l'intensité de la fluorescence moyenne (MFI) de la condition stimulé par rapport à la condition non-stimulé) est montré chez les thymocytes DP et CD8SP pour la molécule CD69 (2 panneaux de gauche) et la molécule CD5 (2 panneaux de droite). Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Représentatif de 2 expériences indépendante.

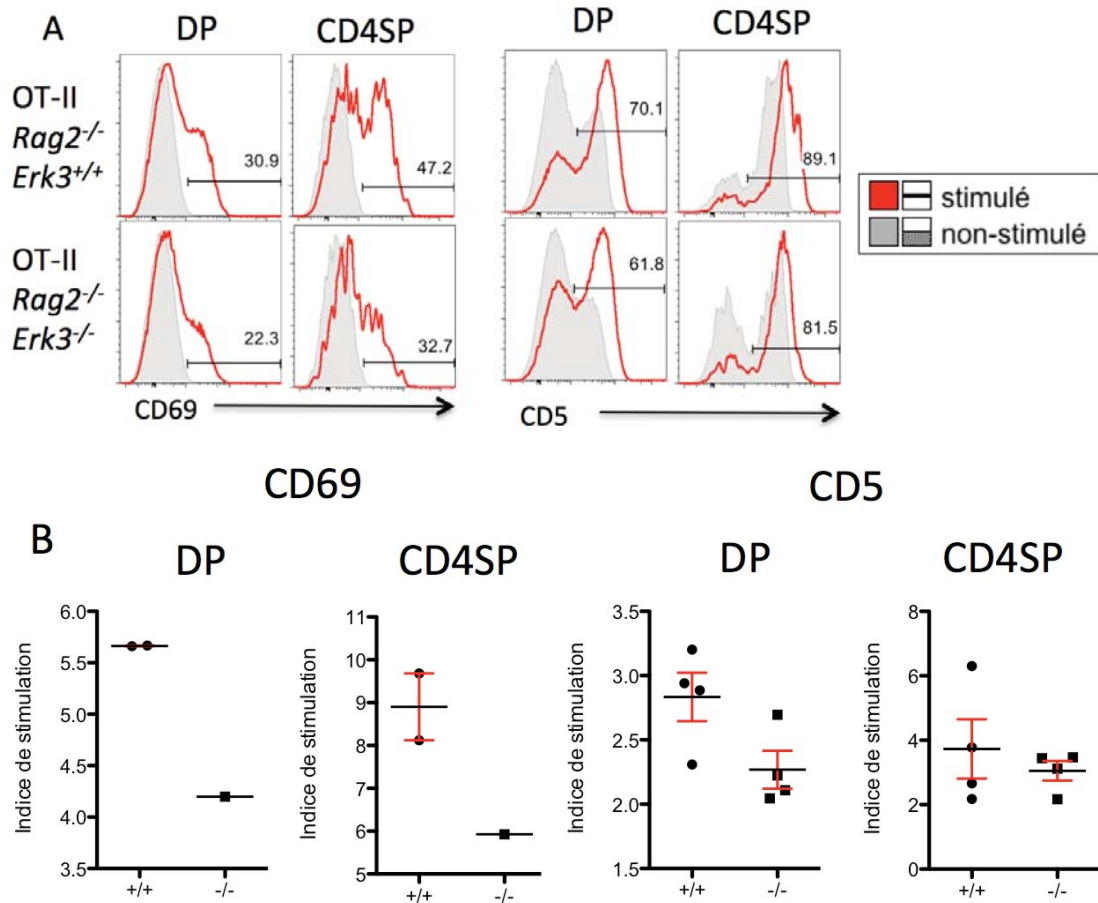


Figure 29. Défaut de l'augmentation de l'expression des molécules CD69 et CD5 chez les thymocytes DP et CD4SP OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-} suite à une stimulation du RCT. (A) Des thymocytes totaux OT-II *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{+/+} ou *Erk3*^{-/-} ont été incubé 24 heures en présence (ligne rouge pleine) ou non (ligne grise remplie) de stimulation du RCT avec de l'anti-CD3. Les thymocytes DP et CD4SP viables (7-AAD⁻) sont présentés sous forme de courbe. Le pourcentage dans chaque figure représente le pourcentage de thymocytes DP ou CD4SP qui deviennent CD69^{fort} (4 panneaux de gauche) et CD5^{fort} (4 panneaux de droite). (B) Indice de stimulation des molécules de la sélection positive CD69 et CD5. Les indices de stimulation (l'intensité de la fluorescence moyenne (MFI) de la condition stimulé par rapport à la condition non-stimulé) est montré chez les thymocytes DP et CD4SP pour la molécule CD69 (2 panneaux de gauche) et la molécule CD5 (2 panneaux de droite). Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Représentatif de 2 expériences indépendante.

Que ce soit chez la souris RCT transgénique OT-I ou OT-II, nous observons que l'expression des molécules CD69 et CD5 des thymocytes DP, CD4SP et CD8SP *Erk3*^{-/-} est toujours moins augmentée que chez la souris WT (Figures 28A et 29A, ligne pleine rouge). De plus, lorsqu'on compare les intensités de la fluorescence moyenne (MFI) des molécules CD69 et CD5 entre la souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-} pour les thymocytes DP, CD4SP et CD8SP, nous voyons que l'indice de stimulation (thymocytes stimulés sur thymocytes non-stimulés) est toujours plus élevé chez le type sauvage (Figures 28B et 29B). En somme, ceci nous indiquerait que même avec un fort signal via leur RCT, les souris *Erk3*^{-/-} ne sont pas capables de passer la sélection positive.

Finalement, nous avons refait l'expérience avec le modèle de souris non-transgénique pour le RCT (Figure 30). Dans la figure 30A, nous pouvons voir clairement la différence d'expression de CD69 et de CD5 entre les thymocytes stimulés DP et CD4SP *Erk3*^{-/-} et de type sauvage. L'augmentation de l'expression de CD69 après une forte stimulation du RCT semble être inexistante pour la souris *Erk3*^{-/-} (Figure 30A, panneaux de gauche). En compilant les résultats (Figure 30B, panneaux de gauche), l'indice de stimulation chez la souris *Erk3*^{-/-} est identique à celui du type sauvage. Pour la molécule CD5, nous remarquons deux populations (les cellules CD5^{fort} et les cellules CD5^{faible}). Avant la stimulation, la majorité des cellules expriment un faible niveau de CD5 (Figure 30A, panneaux de droite, ligne grise remplie). Après stimulation avec de l'anti-CD3, nous pouvons constater une augmentation de l'expression de CD5 (Figure 30A, panneaux de droite, ligne rouge). Les thymocytes DP et CD4SP provenant de la souris de type sauvage deviennent CD5^{fort}. Toutefois, en absence de ERK3, les thymocytes DP et CD4SP gardent un niveau faible d'expression de CD5. En compilant les résultats (Figure 30B, panneaux de droite), l'indice de stimulation chez la souris *Erk3*^{-/-} est plus basse que chez le type sauvage, et ce de façon significative. En conclusion, en présence d'un répertoire polyclonal de RCT, une déficience en ERK3 affecte la sélection positive, et ce même après une forte stimulation du RCT.

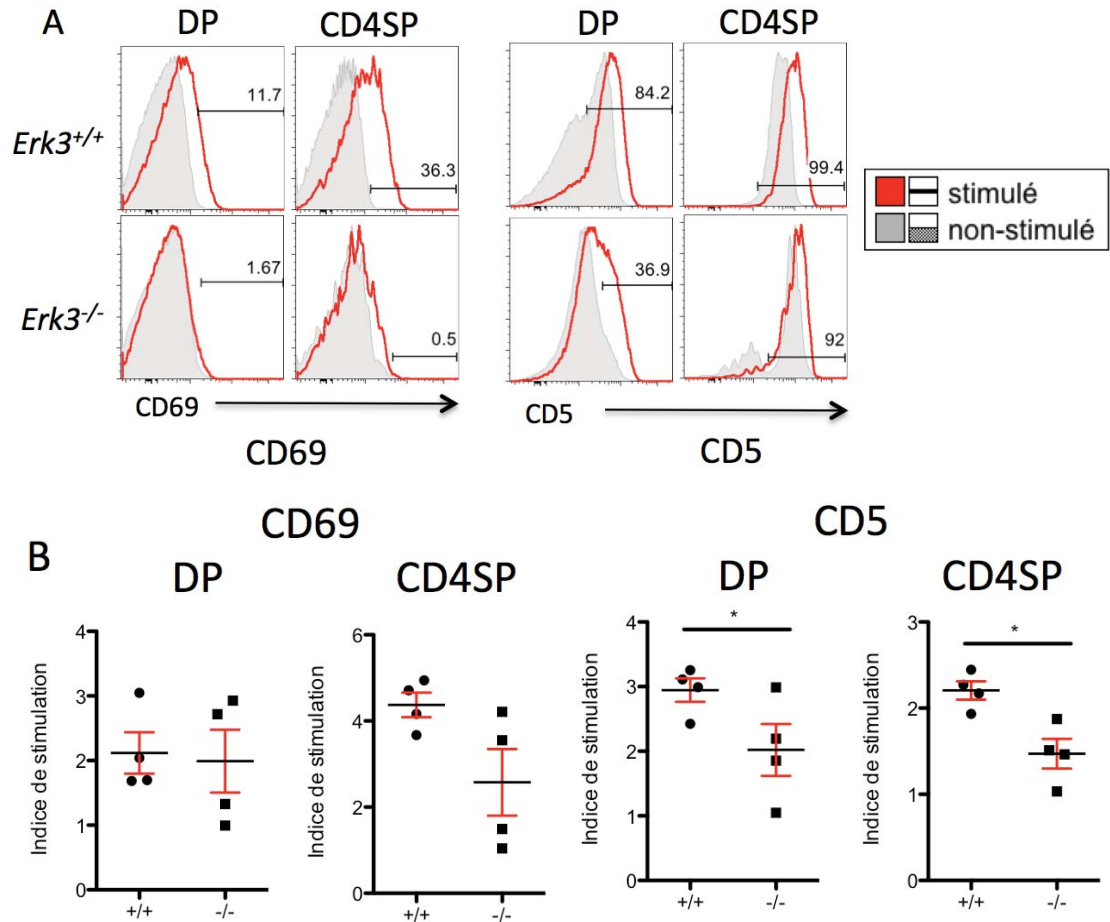


Figure 30. Défaut de l'augmentation de l'expression des molécules CD69 et CD5 chez les thymocytes DP et CD4SP *Erk3*^{-/-} non RCT transgénique suite à une stimulation du RCT (A) Des thymocytes totaux de souris non-transgénique ont été incubé 24 heures en présence (ligne rouge pleine) ou non (ligne grise remplie) de stimulation du RCT avec de l'anti-CD3. Les thymocytes DP et CD4SP viables (7-AAD⁻) sont présentés sous forme de courbe. Le pourcentage dans chaque figure représente le pourcentage de thymocytes DP ou CD4SP qui deviennent CD69^{fort} (4 panneaux de gauche) et CD5^{fort} (4 panneaux de droite). (B) Indice de stimulation des molécules de la sélection positive CD69 et CD5. Les indices de stimulation (l'intensité de la fluorescence moyenne (MFI) de la condition stimulé par rapport à celle de la condition non-stimulé) est montré chez les thymocytes DP et CD4SP pour la molécule CD69 (2 panneaux de gauche) et la molécule CD5 (2 panneaux de droite). Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Représentatif de 3 expériences indépendante.

3.3 Est-ce que la fonction de ERK3 dans le thymus est médiée par MK5 ?

Au cours des dernières années, un substrat potentiel de ERK3 a été identifié. En effet, la MAPKAPK, MK5 (ou PRAK), interagit avec ERK3, *in vivo* et *in vitro*. Il nous

apparaissait donc intéressant d'évaluer si la fonction thymique de ERK3 passait par MK5. Cependant, peu d'étude existe sur les fonctions de MK5. Bref, nous avons analysé le thymus de la souris *Mk5^{-/-}* au stade embryonnaire E19. Afin d'évaluer le rôle de l'interaction ERK3-MK5 dans le développement thymique, nous avons caractérisé le thymus de la souris *Mk5^{-/-}*. Contrairement à la souris *Erk3^{-/-}*, l'absence de MK5 n'influence pas la cellularité totale thymique (Figure 31B). De plus, la distribution des différentes populations de thymocytes DN et DP n'est pas affecté chez la souris *Mk5^{-/-}* (Figure 31A). Toutefois, nous observons le même défaut de différenciation (moins de thymocytes CD4SP) en absence de MK5 ou ERK3 (Figure 31A et C, panneaux de droite). Il est donc possible que la réduction du nombre de CD4SP chez la souris ERK3 passe par MK5. En somme, ERK3 aurait des fonctions dépendantes (la réduction des thymocytes CD4SP) et indépendantes (la réduction du nombre de thymocytes totaux) de MK5.

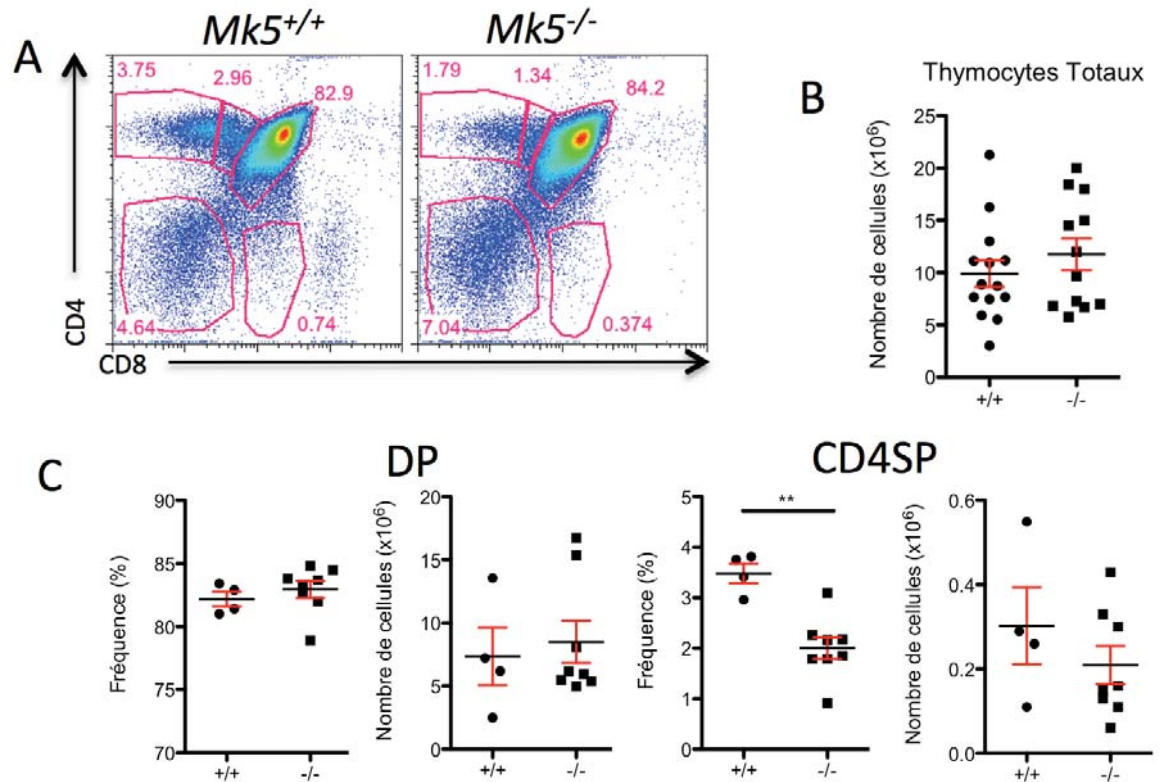


Figure 31. Défaut de différenciation des thymocytes CD4SP chez la souris E19 *Mk5^{-/-}*. (A) Les profils CD4/CD8 de cytométrie en flux sont montrés pour les souris *Mk5^{+/+}* et *Mk5^{-/-}*. Le pourcentage des différentes populations de thymocytes est inscrit à proximité de leur population respective. Résultats représentatifs de 4 expériences indépendantes. (B) Aucune réduction du nombre de thymocytes totaux chez la souris au jour embryonnaire 19 en

absence de MK5. La cellularité totale du thymus est montrée pour les souris $Mk5^{+/+}$ et $Mk5^{-/-}$. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. (C) Différence au niveau du pourcentage de thymocytes CD4SP chez la souris E19 $Mk5^{-/-}$. La cellularité des thymocytes DP et CD4SP est montrée pour les souris $Mk5^{+/+}$ et $Mk5^{-/-}$. Le pourcentage des thymocytes DP et CD4SP est également montré. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney (** : $p > 0,01$)

La réduction du nombre de thymocytes CD4SP chez la souris MK5, nous a amené à évaluer si cette réduction était dû à un défaut de sélection positive, tout comme chez les souris $Erk3^{-/-}$. Nous avons donc utilisé la même approche que précédemment pour évaluer la sélection positive. Nous avons quantifié le nombre de cellules qui ont subi la sélection positive avec les marqueurs CD69 et CD5, qui augmentent après cette sélection (Figure 32). En utilisant une combinaison des marqueurs RCT et CD5 (Figure 32A), nous observons une réduction du pourcentage de cellules qui sont RCT^{fort} - $CD5^{fort}$ chez la souris $Mk5^{-/-}$ chez les populations de thymocytes DP, TDS et CD4SP. La compilation des données (Figure 32C) montre une tendance à la baisse qui n'est pas encore significative, probablement à cause du petit nombre d'animaux utilisés. L'utilisation des marqueurs RCT et CD5 montre une diminution des DP2 qui représente la population venant tout juste de recevoir les signaux de sélection positive. En effet, nous observons, une accumulation de thymocytes DP1 chez la souris $Mk5^{-/-}$ déficiente. De plus, il y a une baisse du pourcentage des thymocytes DP2 et DP3. En conclusion, il semblerait y avoir un défaut de la sélection positive chez la souris $Mk5^{-/-}$. Cependant, nous avons fait cette expérience qu'une seule fois et il faudra la répéter.

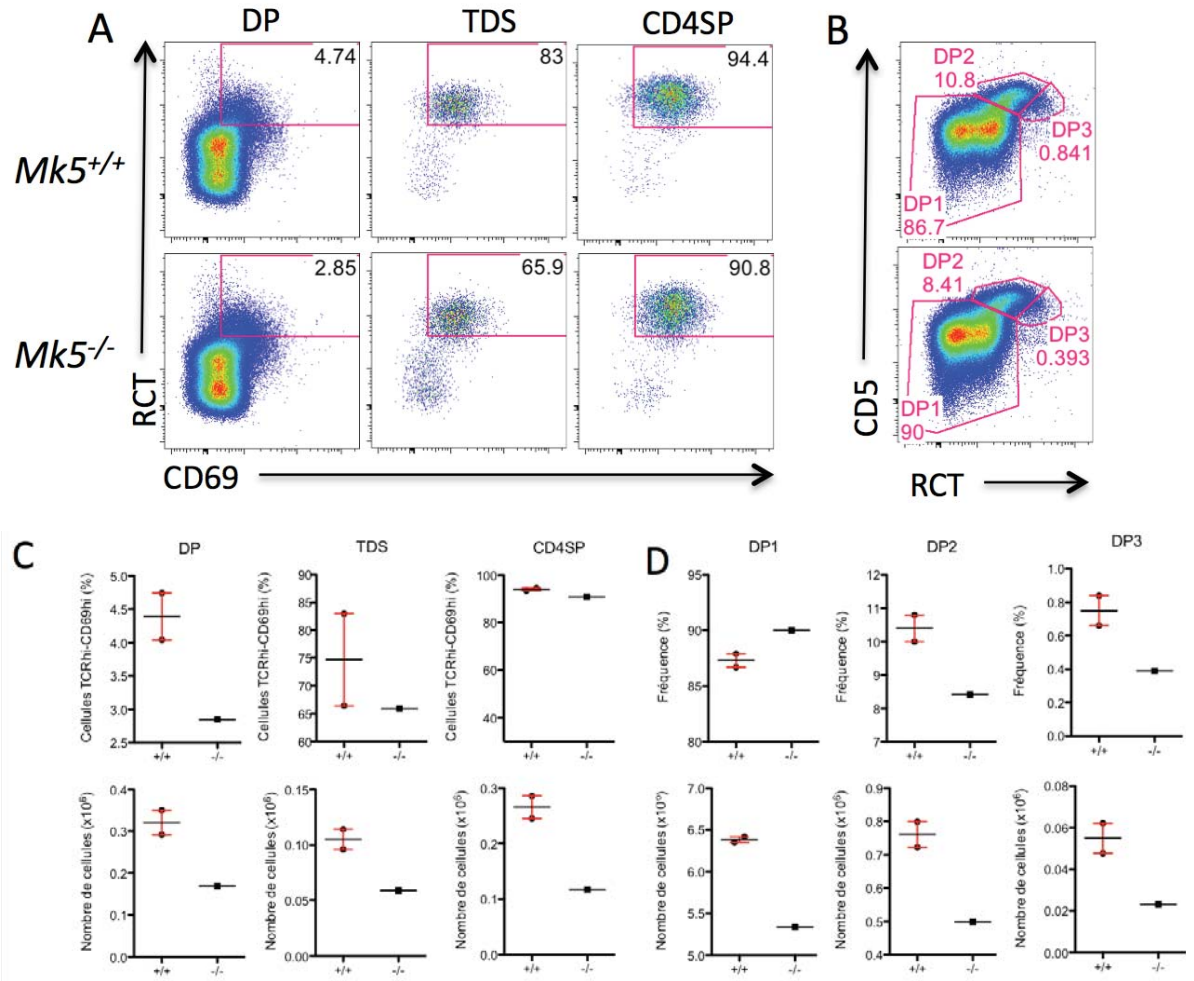


Figure 32. Défaut de la sélection positive chez la souris $Mk5^{-/-}$. (A) Les profils RCT/CD69 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes DP, TDS et CD4SP provenant de souris $Mk5^{+/+}$ ou $Mk5^{-/-}$. La population de thymocytes RCT int CD69 int est encadrée et le pourcentage de cette population y est inscrit. (B) Les profils RCT/CD5 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes DP de souris $Mk5^{+/+}$ et $Mk5^{-/-}$. Les trois populations distinctes sont nommées DP1 (RCT faible CD5 faible), DP2 (RCT int CD5 int) et DP3 (RCT fort CD5 int). Les pourcentages sont inscrits à proximité de leur population respective. (C) Compilation montrant une réduction de nombre de cellules RCT int CD69 int dans les thymocytes DP, TDS et CD4SP chez les souris $Mk5^{-/-}$. Les pourcentages sont montrés dans les panneaux du haut et les nombres cellulaires sont montrés dans les panneaux du bas pour les thymocytes DP, TDS et CD4SP de souris $Mk5^{+/+}$ et $Mk5^{-/-}$. Le trait représente la moyenne (cellularité et fréquence) et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. (D) Compilation montrant une accumulation de cellules au stade DP1 chez la souris $Mk5^{-/-}$. Les pourcentages sont montrés dans les panneaux du haut et les nombres cellulaires sont montrés dans les panneaux du bas pour les thymocytes DP1, DP2 et DP3 pour les souris $Mk5^{+/+}$ et $Mk5^{-/-}$. Le trait représente la moyenne (cellularité et fréquence) et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. Représentatif d'une expérience.

3.4 Est-ce que l'activité catalytique de ERK3 est importante pour médier sa fonction dans le thymus ?

Finalement, au courant de ma maîtrise, j'ai eu l'occasion de travailler sur un nouveau modèle de souris ERK3. En effet, le groupe de Sylvain Meloche a réalisé une souris ERK3, dont le domaine kinase est inactif (*Erk3^{ki/ki}*). Ce nouveau modèle nous a permis de poser de nouvelles hypothèses de recherche, pour savoir si l'activité kinase de ERK3 est essentielle pour sa fonction dans le thymus. Il est important de mentionner que, contrairement aux souris déficientes pour ERK3, les souris *Erk3^{ki/ki}* survivent à la naissance, ce qui nous a permis d'utiliser des souris adultes.

Nous avons analysé le thymus des souris ERK3 kinase inactive (Figure 33). Nous pouvons constater que le thymus de souris ERK3 kinase inactive est identique au type sauvage. En effet, nous ne voyons pas de diminution du nombre de thymocytes DP et CD4SP. De plus, en caractérisant les thymocytes DP chez cette souris, nous pouvons observer le même nombre de cellules exprimant différents niveaux de la molécule RCT (Figure 33B). De plus, en utilisant les molécules RCT et CD5, la maturation des thymocytes DP ERK3 kinase inactive semble être normale, car le nombre des sous populations de DP est équivalent. De plus, nous avons analysé la maturité des thymocytes simple positif. Les cellules RCT^{fort}CD69^{faible} sont présentes en même quantité chez la souris ERK3 kinase inactive que chez le type sauvage (Figure 33D). Les compilations des données nous indiquent clairement qu'aucune différence n'est détectée entre ces souris (Figure 33E - H). En somme, l'activité catalytique ne semble pas être importante pour médier la fonction de ERK3 dans le thymus.

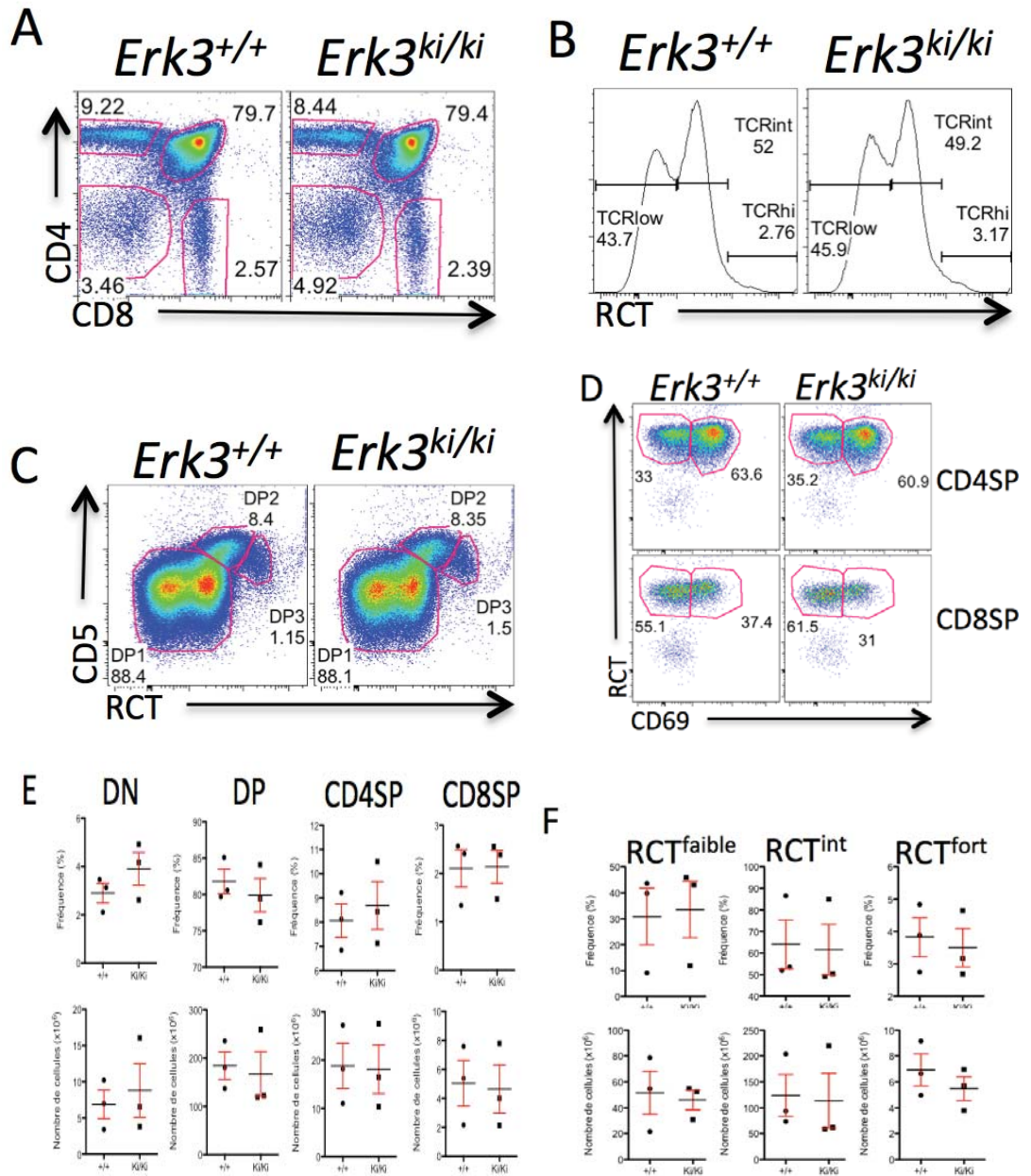


Figure 33. La différenciation thymique est normale chez la souris *Erk3*^{ki/ki} adulte. (A) Les profils CD4/CD8 de cytométrie en flux sont montrés pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{ki/ki}. Le pourcentage des différentes populations de thymocytes est inscrit à proximité de leur population respective. (B) Expression du RCT chez les thymocytes DP *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{ki/ki}. L'expression du RCT peut être divisée en trois sous populations : RCT^{faible}, RCT^{int} et RCT^{fort}. Le nom et le pourcentage des différents sous populations de RCT sont inscrit à proximité de leur population respective. (C) Les profils RCT/CD5 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes DP pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{ki/ki}. Les trois populations distinctes sont nommées DP1 (RCT^{faible}CD5^{faible}), DP2 (RCT^{int}CD5^{fort}) et DP3 (RCT^{fort}CD5^{int}). Le nom et le pourcentage sont inscrits à proximité de leur population respective. (D) Les profils RCT/CD69 de cytométrie sont montrés pour les thymocytes CD4SP et CD8SP pour les souris

Erk3^{+/+} et *Erk3*^{ki/ki}. Les thymocytes CD4SP et CD8SP immature (RCT^{fort}CD69^{fort}) et mature (RCT^{fort}CD69^{faible}) sont montrés. Le pourcentage de ces populations est inscrit à proximité de leur population respective. **(E)** Compilation du pourcentage et du nombre de thymocytes DN, DP, CD4SP et CD8SP pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{ki/ki}. Le trait représente la moyenne et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris. **(F)** Compilation du pourcentage et du nombre de thymocytes DP RCT^{faible}, RCT^{int} et RCT^{fort} pour les souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{ki/ki}. Le trait représente la moyenne (cellularité et fréquence) et les barres d'erreur représentent les erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Chaque point représente une souris.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

4.1 Phénotypage des souris E19 *Erk3*^{-/-}

L'utilisation de souris au jour embryonnaire 19 (E19) *Erk3*^{-/-} au lieu de souris *Erk3*^{-/-} nouveau-nés nous a grandement facilité la tâche pour étudier le rôle de ERK3 dans le développement T. En effet, nous sommes capable de reproduire la très grande majorité du phénotype observé chez les nouveau-nés (Annexe I – Figure 35). Évidemment, nous nous attendions à avoir moins de thymocytes totaux, puisque nous récoltons les thymus plus tôt au cours du développement de la souris. De plus, nous observons une réduction du nombre de cellules pour les thymocytes DP et CD4SP. Toutefois, une réduction n'est clairement définie pour les thymocytes TDS. Cependant, l'écart entre les nombres absolus de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} et les nombres absolus de thymocytes DP de type sauvage des souris nouveau-nées est plus grand que chez les souris E19. Avec ces données, nous pouvons clairement observer une augmentation de l'écart des nombres absolus entre la souris *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-} au fur et à mesure que la souris vieillit. Ceci nous indique que le développement des thymocytes DP à partir des thymocytes DN4 est peut-être bloqué. De plus, le nombre réduit de thymocytes DP pourrait nous indiquer que ces cellules sont entrain de mourir et que pour voir un écart significatif entre le nombre de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} et le nombre de thymocytes DP de type sauvage, il faudrait faire l'étude sur des souris plus vieilles. Il serait aussi pertinent de prélever le thymus des souris E14,5, E15,5, E16,5, E17,5 et E18,5 pour regarder l'évolution du développement T chez les souris *Erk3*^{-/-}. Avec ces données, nous saurons à quel moment précis le développement des thymocytes *Erk3*^{-/-} commence à diverger du type sauvage. Nous serons en mesure d'identifier si le développement T de ces souris est retardé ou non.

De plus, nous observons une réduction totale de la taille du thymus chez la souris *Erk3*^{-/-}. Toutefois, une réduction de la superficie de la médulla peut également être observée chez la souris *Erk3*^{-/-}. Une migration des thymocytes DP vers la médulla est essentielle pour la poursuite de leur maturation. La médulla est un endroit où la sélection négative survient et elle permet la poursuite de la maturation des thymocytes SP. Plusieurs questions peuvent être posées ici. Est-ce qu'une réduction

du nombre de thymocytes CD4SP est causée par l'incapacité de ces cellules à franchir la jonction cortico-médullaire pour se rendre à la médulla ? Il serait pertinent de mesurer les niveaux du récepteur à chimiokine CCR7¹⁹⁵, pour savoir si les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} exprime correctement cette molécule, car cette dernière est essentielle pour permettre la migration d'un thymocyte du cortex vers la médulla. De plus, est ce que les thymocytes CD4SP *Erk3*^{-/-} meurt plus rapidement que thymocytes normaux, qui causerait une réduction de la médulla ? Nos résultats préliminaires *in vitro* nous suggèrent qu'en absence de ERK3, les thymocytes CD4SP meurent plus rapidement *in vitro* (données non-montrées). De plus, il se pourrait très bien que le nombre réduit de thymocytes affecte la grosseur de la médulla du thymus, puisqu'il a été montré que les thymocytes en différenciation régule la morphogénèse du microenvironnement thymique²²⁸. En d'autres termes, moins qu'il y a de thymocytes, moins de signaux sont perçus par les cellules épithéliales thymiques. Ce qui signifie que s'il y a moins de thymocytes simple positifs de générer, la taille de la médulla serait également affectée. Toutefois, cette hypothèse n'est basée que seulement sur des résultats préliminaires. Il faudrait répéter l'expérience.

4.2 Diminution du nombre de thymocytes DP chez la souris *Erk3*^{-/-}

Nous avons mesuré les niveaux d'apoptose des thymocytes *Erk3*^{-/-}, car nous croyons que les thymocytes DP de ces souris étaient plus sensibles à l'apoptose. Toutefois, nous n'avons pas observé de différence dans les niveaux d'apoptose entre les thymocytes *Erk3*^{-/-} et *Erk3*^{+/+}, peu importe la méthode utilisée (par cytométrie en flux ou par immunohistochimie). Par la suite, nous avons décidé de mesurer la demi-vie des thymocytes DP. Nous avons donc, utilisé une culture de thymus fœtaux de 6 jours pour regarder les thymocytes DP après une journée supplémentaire de développement. Si les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} ont une demi-vie plus courte, nous nous attendions à voir une réduction du nombre de cellules plus importante chez les thymocytes *Erk3*^{-/-} que chez les thymocytes *Erk3*^{+/+} au cours du temps. Toutefois, nous n'avons observé aucune réduction du nombre de thymocytes DP. De plus, le nombre de thymocytes

DP *Erk3*^{-/-} est toujours plus bas que celui des thymocytes normaux, malgré une augmentation du nombre de thymocytes DP *Erk3*^{-/-} dans les FTOC de 6 jours. Cette augmentation est causée par des thymocytes DN qui sont toujours en développement et en maturation dans une culture thymique de 6 jours. Il serait pertinent de poursuivre la culture *in vitro* des thymus pour une journée supplémentaire pour regarder et compter les nombres de thymocytes DN et DP.

Par la suite, nous avons mesuré la demi-vie des thymocytes DP à l'aide de l'étude des réarrangements secondaires de la chaîne α du RCT, grâce à une technique de RT-PCR semi-quantitative. En effet, lors de l'étape DP, la chaîne α du RCT est continuellement réarrangée jusqu'à ce qu'un RCT fonctionnel et restreint au CMH soit formé. Les réarrangements secondaires de la chaîne α sont un processus séquentiels. Pour les segments V α , les réarrangements se font à partir de la région 3' (V α 1) vers la région 5' (V α 80) et pour les segments J α , les réarrangements se déplacent de la région 5' (J α 61) vers la région 3' (J α 1). Si les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} ont une demi-vie plus courte, nous nous attendions à voir moins de réarrangements utilisant les V α J α plus distaux. C'est effectivement le cas. Une question peut alors se poser : Pourquoi ne voit-on pas plus d'apoptose chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}, malgré une demi-vie plus courte ? Il est possible qu'il y ait plus d'apoptose chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}, mais que nos moyens de détection de l'apoptose ne sont pas au point. Il se pourrait fort bien que nous devions réduire notre fenêtre de détection, car l'apoptose est un processus qui survient très rapidement. De plus, il est possible que ces thymocytes meurent par un processus autre que l'apoptose dite « classique ». Plusieurs autres voies de la mort cellulaire programmée ont été découvertes récemment. Ces voies, appelées mort cellulaire programmée caspase-indépendante, induit une mort cellulaire sans avoir recourt aux capsases^{196,197}. Notre incapacité de détecter une augmentation des niveaux d'apoptose chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} nous indique que, ces thymocytes meurt par un autre processus. Il serait alors pertinent de mesurer la relâche de la protéase cathepsine dans le cytoplasme, qui survient lors de la mort cellulaire programmée caspase-indépendante¹⁹⁷. De plus, il est possible que les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} soient en sénescence. La sénescence est

définie par l'impossibilité des cellules à se diviser. Il se peut fort bien que les thymocytes DP *Erk3*^{-/-} soient plus sensible à la sénescence. Il existe des marqueurs moléculaires permettant de caractériser les cellules en sénescence. Il serait pertinent de regarder quelque unes de ces molécules (Ki67, p21 (CDKN1A), γ H2AX, SAHF et Sen- β -Gal), pour regarder l'état de sénescence des thymocytes *Erk3*^{-/-} ²¹⁸.

Une autre façon de mesurer la demi-vie des thymocytes DP est par l'apparition de cellules iNKT (invariant Natural Killer T cells). En effet, les iNKT proviennent des thymocytes DP qui ont réussi à reconnaître la molécule CMH non-classique CD1d avec un ligand, qui est généralement d'origine glycolipidique. Bref, les cellules iNKT reconnaissent des antigènes glycolipidiques présentés par la molécule CD1d. Toutefois, leur apparition requiert que les thymocytes DP possèdent une longue demi-vie pour permettre le réarrangement du RCT avec des segments distaux V α 14-J α 18 chez la souris. Les cellules iNKT sont invariantes pour leur RCT et ce dernier est toujours V α 14-J α 18 ¹⁹⁸. Toutefois, les iNKT sont formées à partir de thymocytes DP âgés de 3 à 4 jours. Donc, en utilisant des souris de E19, les cellules iNKT ne sont pas formées. Malgré cela, nous avons tenté de mesurer le segment V α 14-J α 18 par PCR semi-quantitative. Toutefois, nous n'observons aucune amplification d'ADN pour ce segment, et ce même pour le type sauvage. Pour résoudre ce problème, nous avons le choix d'utiliser les chimères hématopoïétiques pour regarder la présence des cellules iNKT. Pour pouvoir les observer, nous prélèverons le thymus ou la rate pour regarder les iNKT grâce à la cytométrie en flux. Nous procéderons à un marquage classique pour déterminer le nombre de iNKT grâce à l'anticorps anti-RCT et au tétramère CD1d. Les iNKT seront positifs pour ces deux marqueurs. Avec ces chimères, nous saurons une fois pour toute si le nombre d'iNKT est réduit chez la souris *Erk3*^{-/-}, ce qui supporterait l'idée d'une réduction de la demi-vie des thymocytes DP.

Des travaux précédents dans le laboratoire ont démontré qu'il y a une accumulation de bris double brins causés par RAG dans les thymocytes DP chez les souris *Erk3*^{-/-}. Il est donc possible que la diminution des réarrangements secondaires de la chaîne α

du RCT soit due à un défaut de réparation des bris doubles brins de l'ADN causé par RAG. Il serait alors très pertinent de mesurer le niveau des protéines responsables de réparer les bris d'ADN, telles que l'ADN ligase IV ou la XRCC4. Il serait important de mesurer l'activité des protéines responsable du NHEJ (Ku70/80, DNA-PKcs, artemis, ADN ligase IV et XRCC4) pour la réparation de l'ADN.

Récemment, plusieurs études ont été publiées démontrant le rôle important de molécules qui aident à la survie des thymocytes DP. Tout d'abord, la première molécule qui nous vient immédiatement à l'esprit est la molécule ROR- γ t. Plusieurs études existent sur le rôle important de cette molécule lors de l'étape de développement DP. Cette protéine est fortement exprimée chez les thymocytes DP et elle fait partie de la voie de signalisation de Bcl-X_L, une molécule qui promouvoit la survie des thymocytes DP ¹⁹⁸. Une autre molécule qui semble jouer un rôle important dans la survie des thymocytes DP est la sérine/thréonine kinase LKB1. Cette protéine régule l'activité de la kinase AMP qui, à son tour, module l'expression de Bcl-X_L ¹⁹⁹. Une autre protéine jouant un rôle important pour la survie des thymocytes DP est le facteur des cellules T-1 (T-Cell Factor-1 ; TCF-1). La molécule TCF-1 améliore la survie des thymocytes DP par l'augmentation transcriptionnelle de ROR- γ t, qui est une molécule essentielle à la survie des thymocytes DP ²⁰⁰. Finalement, Bcl11B permet la survie des thymocytes DP ²⁰¹. Dans le modèle de souris Bcl11B^{fl/fl} CD4-Cre, qui arrête d'exprimer Bcl11B chez les thymocytes DP, il y a une forte réduction du nombre de thymocytes DP, tout comme chez les souris *Erk3*^{-/-} ²⁰¹. Il serait fort intéressant de pouvoir étudier l'effet de ces molécules dans notre modèle *Erk3*^{-/-} pour savoir si ERK3 affecterait ces molécules importantes pour la survie des thymocytes DP. L'étude du profil d'expression génique par puce à ADN serait une technique très intéressante à utiliser pour pouvoir vérifier l'expression génique de ces molécules. Nous pourrions ensuite confirmer les résultats obtenus par qPCR et par un immunobuvardage de type Western. Il est donc normal de penser qu'ERK3 pourrait influencer l'expression ou l'activité de TCF-1, ROR- γ t, Bcl11B, LKB1 ou Bcl-X_L chez les thymocytes DP.

4.3 Diminution du nombre de thymocytes CD4SP chez la souris *Erk3*^{-/-}

Malgré que la diminution du nombre de thymocytes CD4SP *Erk3*^{-/-} est plus importante que chez les DP *Erk3*^{-/-}, la réduction du nombre de thymocytes DP peut également expliquer en partie pourquoi il y a moins de thymocytes CD4SP. En regardant des marqueurs de la sélection positive, RCT, CD69 et CD5, nous avons pu conclure qu'il a effectivement un défaut de la sélection positive, à cause du nombre réduit de cellules RCT^{fort}-CD69^{fort} dans les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}. De plus, même avec la caractérisation des thymocytes DP1 à DP3 *Erk3*^{-/-} grâce aux marqueurs RCT et CD5, nous pouvons clairement voir l'incapacité des thymocytes DP1 à transiter vers l'étape DP2. En effet, il y a toujours plus de thymocytes TDS dans une souris de type sauvage par rapport à la souris *Erk3*^{-/-}. Dans le cas des OT-I *Rag2*^{-/-} *Erk3*^{-/-}, nous nous attendions à observer une population DP3. Toutefois, nous observons presque aucun DP3. Nous nous sommes posés la question à savoir s'il y a un retard du développement des thymocytes chez ces souris. Peut-être que l'accumulation en DP1 est due au fait que la souris ERK3 déficiente a un retard développemental. Pour répondre à notre question, nous voulons injecter, de façon intrathymique, des thymocytes DP1 et DP2 déficients pour ERK3 dans une souris ERK3 WT préalablement irradiée pour voir si nous sommes capables de voir l'apparition des thymocytes DP3. De plus, selon l'étude de *Saini et al.*¹⁶², les niveaux de ZAP-70 augmentent lorsque les thymocytes DP1 passent au stade DP3. Il serait pertinent de mesurer les niveaux de ZAP-70 phosphorylés dans les thymocytes DP1, DP2 et DP3, car une phosphorylation de ZAP-70 nous indiquerait qu'un signal est transduit normalement via le RCT.

4.4 Modèle

Toutefois, est-ce que la signalisation via le RCT des souris *Erk3*^{-/-} est affectée ? Nous savons que la voie de signalisation du RCT est affecté, puisque même avec un signal très fort provoqué par de l'anti-CD3 *in vitro*, le niveau des molécules CD5 et CD69

n'est pas le même chez la souris *Erk3*^{-/-} et la souris de type sauvage. Même si l'on force la sélection par l'utilisation de modèle RCT transgénique, nous sommes incapable d'obtenir des niveaux normaux de CD5 et de CD69. De plus, le niveau de RCT présent à la surface des thymocytes DP est moins élevé chez les souris *Erk3*^{-/-} que chez la souris de type sauvage. Toutefois, il existe plusieurs molécules qui peuvent nous indiquer s'il y a un défaut de la voie de signalisation du RCT. Premièrement, il y a la protéine LAT, qui joue un rôle clé dans la transduction du signal du RCT. Le niveau de phosphorylation de cette protéine adaptatrice dépend principalement de l'affinité du RCT pour un complexe CMH/peptide donné. En effet, plus LAT est phosphorylée, plus l'affinité entre le RCT et le complexe CMH/peptide est grande ¹⁸¹. Cette phosphorylation permet même de discriminer les signaux induisant la sélection positive et la sélection négative ^{95,181}. Dans une étude publiée récemment, une nouvelle protéine, nommée Gasp, a été identifiée. Gasp est une protéine qui est associée à Grb2-SOS, qui est associée à LAT. Ce qui est intéressant de Gasp, c'est que cette dernière semble être importante pour la sélection positive uniquement ²²⁰. Il se pourrait que ERK3 joue un rôle synergique avec Gasp pour permettre une sélection positive efficace des thymocytes.

Pour continuer, la protéine ZAP-70 pourrait être grandement affectée par l'absence de ERK3. En effet, ZAP-70 est une autre protéine importante pour la transduction du signal du RCT. Tout comme mentionner précédemment, il serait fort intéressant de mesurer les niveaux de phosphorylation de ZAP-70 chez la souris *Erk3*^{-/-}. De plus, ERK3 pourrait même interagir directement avec ZAP-70. Dans le même ordre d'idée, une Rho GTPase, RhoH, semble être requise pour recruter et activer ZAP-70 pour permettre la signalisation du RCT ²²¹⁻²²². Sans un RhoH fonctionnel, il serait impossible pour un thymocyte ou lymphocyte T de transmettre un signal via son RCT.

Ensuite, ZAP-70 semble être importante pour le recrutement de la protéine Vav. Vav est une Rho-GEF (Guanin Exchange Factor) qui impliqué dans la voie de signalisation du RCT et du RCB ²²³. En créant une délétion de la protéine Vav1, les thymocytes en sont grandement affectés, puisque les nombres et les pourcentages

chutes dramatiquement chez les thymocytes DN4, DP et CD4SP *Vav1*^{-/-} ²²³⁻²³⁰. LA protéine Vav1 sert de facteur d'échange pour les Rho GTPases. Les principales Rho GTPases qui interagissent avec Vav1 sont Rac et Cdc14. Deux études publiées au cours de la dernière décennie ont démontré un rôle possible de Rac et Cdc14 dans la survie cellulaire des thymocytes ²²⁵⁻²³¹. En effet, dans un modèle de souris transgénique dominant négatif pour la protéine Rac (dnRac-1), il semble que l'absence d'une protéine Rac fonctionnelle augmente l'apoptose de façon spontanée dans les thymocytes DP ²³¹. De plus, en utilisant une souris transgénique pour la protéine Cdc14, il a été démontré que l'expression transgénique du Cdc14 activité (Cdc14^{Q61L}) augmente l'apoptose chez les lymphocytes matures et immatures ²²⁵. Ceci est très pertinent au modèle de souris *Erk3*^{-/-}, car toutes les évidences expérimentales proposent un problème de survie pour les thymocytes DP. Il se pourrait bien que ERK3 partagerait ce rôle avec ces Rho GTPases, puisque nous avons démontré précédemment qu'il y a une diminution significative du nombre et du pourcentage de thymocytes DP et CD4SP *Erk3*^{-/-} par rapport au type sauvage. De plus, le thymus de la souris *Rac*^{-/-} a été caractérisé. *Dumont et al.* ont démontré que les nombres de thymocytes DP et SP chutent dramatiquement par rapport aux nombres de thymocytes du type sauvage ²²⁶, tout comme chez la souris *Erk3*^{-/-}. Il est possible de penser que ERK3 et Rac se situent dans la même voie de signalisation.

Il est possible que la fonction de ERK3 soit médiée par les signaux perçu par le RCT. En effet, tout récemment, les kinases p-21-activated (PAK) ont été démontrées comme étant capable de phosphoryler ERK3 ⁶³, malgré le fait que ERK3 est constitutivement phosphorylé dans les cellules au repos ²¹⁹. Toutefois, la forme catalytiquement inactive de ERK3 est également phosphorylée sur le résidu Ser189, ce qui indique que la phosphorylation de la boucle d'activation est médiée par une kinase en amont de ERK3 ²¹⁹. Ceci est très intéressant puisque ces mêmes PAK sont régulés par des protéines Rho GTPases, particulièrement Rac ²²⁷. Alors, PAK est en amont de ERK3 dans la voie de signalisation. Il serait très pertinent de vérifier si les diminutions du nombre et du pourcentage de thymocytes DP et CD4SP *Pak*^{-/-} par rapport au type sauvage sont identiques à celles de la souris *Erk3*^{-/-}. Puisque les

nombre de thymocytes DP et SP de la souris *Rac*^{-/-} chutent dramatiquement par rapport aux nombre de thymocytes du type sauvage et que la protéine RAC serait en amont de PAK dans la voie de signalisation, je crois fermement que la souris *Pak*^{-/-} présentera un phénotype similaire aux souris *Erk3*^{-/-} et *Rac*^{-/-} en ce qui concerne les nombre de thymocytes DP et CD4SP.

Par la suite, dans la même ligne d'idée, les niveau de phospho-ERK1/2 permettent de discriminer un signal du RCT fort d'un signal faible. Après la sélection positive, les niveau de p-ERK1/2 augmentent, puisque la phosphorylation de ERK1/2 augmente en fonction de la phosphorylation de LAT. En effet, une activation lente et soutenue de ERK1/2 permet aux thymocytes DP de passer la sélection positive, car les signaux de survie se mettent en marche. Toutefois, si le signal est fort et transitoire, ERK1/2 est plus activée et les signaux d'apoptose sont en marche. Il est donc possible que ERK3 est une protéine effectrice des MAPK classiques ERK1/2, car ces dernières sont également importantes lors de la sélection positive. Pour vérifier cela, il faudrait regarder les niveau de phosphorylation de ERK1/2 par immunobuvardage de type Western ou par cytométrie en flux des thymocytes de souris *Erk3*^{-/-}. Toutefois, il faudrait activer brièvement les thymocytes avant de pouvoir les utiliser. Il est également plausible de penser que ERK3 soit en aval de la voie de signalisation de ERK1/2 dans le développement thymique, puisque des résultats non publiés du laboratoire ont démontré que l'expression de ERK3 est induite par l'activation de ERK1/2 dans les lymphocytes T matures.

Finalement, pour évaluer en plus grande profondeur le phénotype de la souris *Erk3*^{-/-} concernant la sélection positive, nous pourrions regarder d'autres molécules, comme la calcineurine, Grb2 RasGRP1. La calcineurine est importante pour moduler les signaux perçus par le RCT. En effet, la calcineurine permet l'activation de la voie de NFAT pour permettre la sélection positive. Il serait alors très pertinent de regarder les influx de calcium dans les thymocytes DP de souris *Erk3*^{-/-}. Le modèle de souris de Grb2 et de RasGRP1 possèdent des phénotypes semblables au thymocytes DP *Erk3*^{-/-}. En effet, des mutants Grb2 et RasGRP1 sont incapables de passer la sélection positive

de façon efficace ²⁰³. Avec toutes ces informations, nous sommes donc en mesure de proposer le modèle suivant. (Figure 34).

Premièrement, le RCT entre en contact avec un complexe CMH/peptide. Ensuite, un signal est transduit via le RCT et est perçu par LAT et ZAP-70. Cette dernière active Vav et permet l'activation des Rho GTPases, dont Rac. Par la suite, Rac active PAK, qui active ERK3 dans sa boucle d'activation ⁶³. Finalement, ERK3 interagit avec MK5 pour permettre la sélection positive des thymocytes DP. Toutefois, nous ne connaissons pas l'intermédiaire entre ERK3 et la réduction du nombre de thymocytes DP. Deux candidats ont toutefois été proposés, deux Rho GTPases, Rac et Cdc42 ²²⁴⁻²²⁵. Il est même probable qu'il n'y aurait pas d'intermédiaire et que ERK3 agirait sur la survie des thymocytes DP. En effet, l'absence de ERK3 chez les thymocytes DP de souris serait l'unique cause du déclin du nombre de cellules observées.

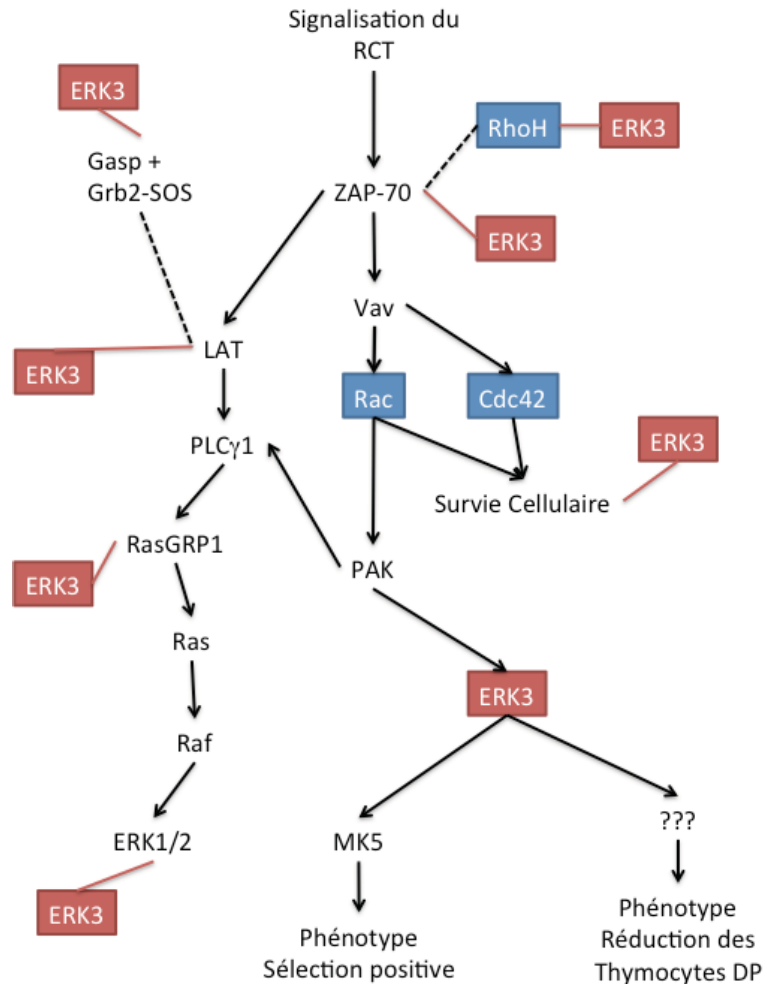


Figure 34. Modèle expliquant le rôle de ERK3 dans le développement thymique. Le RCT reçoit un signal. Ce signal est transmis à LAT et ZAP-70. Ensuite, ZAP-70 active Vav, qui active, à son tour, des Rho GTPases, Rac et Cdc42. Rac active PAK. PAK phosphoryle ERK3 et ce dernier active MK5, qui serait responsable du phénotype de la sélection positive. Nous ne savons pas l'identité de l'intermédiaire entre l'activité de ERK3 et le phénotype observé chez les thymocytes DP. La molécule d'intérêt, ERK3, est en rouge. Les Rho GTPases sont en bleu.

Finalement, il est possible que des molécules de costimulation, notamment CD28, pourraient jouer un rôle lors de la signalisation via le RCT. En effet, la signalisation de CD28 implique l'activation des Rho GTPases, Rac et Cdc42, qui activent à leur tour la voie de signalisation PAK.

4.5 Est-ce que la fonction de ERK3 dans le thymus est médiée par MK5 ou par son activité catalytique ?

Finalement, nous avons regardé le développement thymique dans 2 nouveaux modèles de souris, soit les souris déficientes pour MK5 ou les souris ERK3 dont le domaine kinase est inactif. Au cours des dernières années, MK5 a été identifié comme partenaire d'interaction et substrat de ERK3^{67,74}. Il était donc logique d'utiliser ce modèle pour regarder le développement T afin de savoir si la fonction de ERK3 est médiée par MK5 dans le thymus. Nous avons donc caractérisé le thymus des souris *Mk5*^{-/-}. Premièrement, nous avons observé deux phénotypes distincts. Le premier est la réduction du nombre de thymocytes CD4SP et la deuxième est le nombre normal de thymocytes DP. De plus, nous avons constaté que la souris *Mk5*^{-/-} présente un défaut de la sélection positive, car les thymocytes DP sont moins RCT^{fort} et CD69^{fort}. Ce défaut de la sélection positive entraîne une baisse du nombre de thymocytes CD4SP. Cependant, cette expérience ne confirme pas directement que ERK3 et MK5 interagissent ensemble. Nous purifierons les thymocytes DP et extrairons les protéines pour être analysé par co-immunoprécipitation pour déterminer si les deux interagissent ensemble. La co-immunoprécipitation est considérée comme l'expérience par excellence pour déterminer des interactions protéiques, surtout au niveau de protéines endogènes. Toutefois, cette technique a des limitations. En effet, un résultat positif d'interaction protéique nous indiquerait qu'il y a une interaction directe ou indirecte, c'est-à-dire qu'il y a une possibilité que d'autres protéines pourraient former un complexe avec ERK3 et MK5. Le fait que nous observons une réduction du nombre de thymocytes DP chez la souris *Erk3*^{-/-} et non chez la souris *Mk5*^{-/-} nous indique qu'il y a d'autres protéines qui médient la fonction de ERK3 dans le thymus. Grâce à la technique mentionnée ci-dessus, nous aurons peut-être la chance de découvrir d'autres protéines qui interagissent avec ERK3 et impliqués dans le développement des lymphocytes T.

Le second modèle que nous avons utilisé est une souris dont le domaine kinase de ERK3 est inactif. Le premier phénotype observable était que les souris survivaient à

la naissance contrairement aux souris *Erk3*^{-/-} conventionnelles. Nous avons donc caractérisé le thymus chez la souris ERK3 kinase inactive. Nous n'avons observé aucune différence entre la souris de type sauvage et la souris *Erk3*^{ki/ki}. Toutes les populations de thymocytes sont identiques en pourcentage et en nombre. Nous pouvons donc conclure de deux façons, soit que le domaine kinase de ERK3 n'est pas important pour médier sa fonction dans le thymus et que c'est la présence elle-même qui est important pour l'interaction avec des substrats de ERK3, soit que les souris ERK3 kinase inactif présente un retard du développement T et qu'au moment que nous prélevons les thymus, 7 à 8 semaines après la naissance, le retard est rattrapé. Pour répondre à cette hypothèse, il faudrait prélever les thymus de souris E19 et analyser le thymus. Si l'activité kinase ne serait pas nécessaire, une autre possibilité survient. En effet, aucune fonction n'a été attribuée à la portion c-terminale de ERK3 à ce jour. Il serait alors pertinent de créer une souris dont la partie c-terminale a été éliminé. Par la suite, une analyse du thymus de ces souris serait faite.

4.6 Conclusions

En conclusion, nous avons tenté de répondre à plusieurs questions abordées tout au long de ce mémoire. Tout d'abord, nous avons voulu savoir pourquoi y a t'il moins de thymocytes DP chez la souris *Erk3^{-/-}*. Grâce à des techniques de cytométrie en flux, d'immuno-histochimie et de culture cellulaire, il n'a pas été possible de déterminer si les thymocytes DP *Erk3^{-/-}* mourraient plus par apoptose. Par la suite, nous nous sommes posés une nouvelle question pour savoir si la demi-vie des thymocytes DP *Erk3^{-/-}* est plus courte que chez les thymocytes DP de type sauvage. Nous avons tenté de répondre à cette par l'utilisation de FTOC de 5 et 6 jours. Toutefois, aucune diminution accélérée du nombre de thymocytes DP *Erk3^{-/-}* dans des cultures de thymus fœtaux de 6 jours n'a été trouvés. Pour finalement démontrer que la réduction du nombre de thymocytes DP *Erk3^{-/-}* est probablement causée par une diminution de la demi-vie de ces cellules, nous avons mesuré la demi-vie des thymocytes DP par les réarrangements secondaires de la chaîne α du RCT. Nous avons moins de réarrangement de régions distales des segments V α -J α . De plus, l'accumulation de bris double brin de l'ADN peut également contribuer à la diminution du nombre de thymocytes DP et de leur demi-vie. De plus, nous observons un défaut de la sélection positive chez les souris *Erk3^{-/-}*, qui pourrait expliquer le faible nombre de thymocytes CD4SP. ERK3 et MK5 serait donc nécessaire pour permettre aux thymocytes DP de franchir la sélection positive et devenir des thymocytes CD4SP ou CD8SP. Finalement, il est probable de penser que ce soit la protéine entière et non le domaine kinase de ERK3 qui permettrait une interaction avec MK5. Toutefois, ceci reste à être confirmé. Pour continuer, plusieurs expériences restent à faire confirmer que la voie de signalisation du RCT est grandement affectée dans les thymocytes DP *Erk3^{-/-}*. Il serait pertinent de regarder les niveaux de phosphorylation des molécules ERK1/2, suite à une stimulation du RCT chez les souris *Erk3^{-/-}*. Ces études ont démontré pour la première fois le rôle important d'une MAPK atypique dans le développement T. Malgré toutes ces nouvelles données, beaucoup de questions sont sans réponse. Est-ce qu'il y a d'autres substrats de ERK3 dans le thymus? Est-ce que le facteur de transcription ROR- γ t est affecté dans les thymocytes DP *Erk3^{-/-}*? L'identification du

rôle de ERK3 et MK5 dans le développement thymique pourrait, éventuellement un jour, permettre d'élaborer de meilleures stratégies pour la reconstitution du système immunitaire chez des patients immuno-supprimés.

CHAPITRE 5. RÉFÉRENCES

1. Huang, P., Han, J. & Hui, L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell* **1**, 218–226 (2010).
2. Pearson, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**, 153–183 (2001).
3. Boutros, T., Chevet, E. & Metrakos, P. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/MAP Kinase Phosphatase Regulation: Roles in Cell Growth, Death, and Cancer. *Pharmacological Reviews* **60**, 261–310 (2008).
4. Wagner, E. F. & Nebreda, Á. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. 1–13 (2009).doi:10.1038/nrc2694
5. Coulombe, P. & Meloche, S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1376–1387 (2007).
6. Cargnello, M. & Roux, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75**, 50–83 (2011).
7. Chen, Z. *et al.* MAP Kinases. *Chem. Rev.* **101**, 2449–2476 (2001).
8. Boulton, T. G. & Cobb, M. H. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul.* **2**, 357–371 (1991).
9. Gonzalez, F. A., Raden, D. L., Rigby, M. R. & Davis, R. J. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett.* **304**, 170–178 (1992).
10. Yung, Y. ERK1b, a 46-kDa ERK Isoform That Is Differentially Regulated by MEK. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 15799–15808 (2000).
11. Shaul, Y. D. & Seger, R. ERK1c regulates Golgi fragmentation during mitosis. *J. Cell Biol.* **172**, 885–897 (2006).
12. Shaul, Y. D., Gibor, G., Plotnikov, A. & Seger, R. Specific phosphorylation and activation of ERK1c by MEK1b: a unique route in the ERK cascade. *Genes & Development* **23**, 1779–1790 (2009).
13. Raman, M., Chen, W. & Cobb, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100–3112 (2007).
14. Karnoub, A. E. & Weinberg, R. A. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 517–531 (2008).
15. Lenormand, P. *et al.* Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122**, 1079–1088 (1993).
16. Chen, R. H., Sarnecki, C. & Blenis, J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* **12**, 915–927 (1992).
17. Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A. & Seger, R. The subcellular localization of MEK and ERK—A novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Molecular and Cellular Endocrinology* **314**, 213–220 (2010).
18. Yoon, S. & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21–44 (2006).
19. Meloche, S. & Pouyssegur, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**, 3227–3239 (2007).

20. Lee, J. C. *et al.* A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**, 739–746 (1994).
21. Cuadrado, A. & Nebreda, Á. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* **429**, 403–417 (2010).
22. Jiang, Y. *et al.* Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* **271**, 17920–17926 (1996).
23. Bradley, J. R. & Pober, J. S. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* **20**, 6482–6491 (2001).
24. Goldsmith, Z. G. & Dhanasekaran, D. N. G Protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**, 3122–3142 (2007).
25. Bagrodia, S., Dérjard, B., Davis, R. J. & Cerione, R. A. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**, 27995–27998 (1995).
26. Stein, B., Brady, H., Yang, M. X., Young, D. B. & Barbosa, M. S. Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade. *J Biol Chem* **271**, 11427–11433 (1996).
27. Han, J. *et al.* Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* **271**, 2886–2891 (1996).
28. Meier, R., Rouse, J., Cuenda, A., Nebreda, A. R. & Cohen, P. Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur. J. Biochem.* **236**, 796–805 (1996).
29. Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol.* **8**, 1049–1057 (1998).
30. Raingeaud, J. *et al.* Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**, 7420–7426 (1995).
31. Gaestel, M. MAPKAP kinases - MKs - two“s company, three”s a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 120–130 (2006).
32. Thornton, T. M. & Rincon, M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 44–51 (2009).
33. Cuenda, A. & Rousseau, S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**, 1358–1375 (2007).
34. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* **265**, 17355–17363 (1990).
35. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. & Karin, M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & Development* **7**, 2135–2148 (1993).
36. Kyriakis, J. M., Brautigan, D. L., Ingebritsen, T. S. & Avruch, J. pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* **266**, 10043–10046 (1991).

37. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* **271**, 24313–24316 (1996).
38. Kyriakis, J. M. *et al.* The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156–160 (1994).
39. Bogoyevitch, M. A., Ngoei, K. R. W., Zhao, T. T., Yeap, Y. Y. C. & Ng, D. C. H. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges. *BBA - Proteins and Proteomics* **1804**, 463–475 (2010).
40. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**, 807–869 (2001).
41. Mizukami, Y., Yoshioka, K., Morimoto, S. & Yoshida, K. I. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* **272**, 16657–16662 (1997).
42. Weston, C. R. & Davis, R. J. The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 14–21 (2002).
43. Jaeschke, A. *et al.* JNK2 Is a Positive Regulator of the cJun Transcription Factor. *Molecular Cell* **23**, 899–911 (2006).
44. Sabapathy, K. *et al.* Distinct Roles for JNK1 and JNK2 in Regulating JNK Activity and c-Jun-Dependent Cell Proliferation. *Molecular Cell* **15**, 713–725 (2004).
45. Dhanasekaran, D. N. & Reddy, E. P. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245–6251 (2008).
46. English, J. M., Vanderbilt, C. A., Xu, S., Marcus, S. & Cobb, M. H. Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* **270**, 28897–28902 (1995).
47. Zhou, G., Bao, Z. Q. & Dixon, J. E. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **270**, 12665–12669 (1995).
48. Lee, J. D., Ulevitch, R. J. & Han, J. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **213**, 715–724 (1995).
49. Yan, C. Molecular Cloning of Mouse ERK5/BMK1 Splice Variants and Characterization of ERK5 Functional Domains. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 10870–10878 (2001).
50. Yan, L. *et al.* Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* **3**, 11 (2003).
51. Wang, X. *et al.* Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell Death Differ* **13**, 2099–2108 (2006).
52. Woo, M. S., Ohta, Y., Rabinovitz, I., Stossel, T. P. & Blenis, J. Ribosomal S6 kinase (RSK) regulates phosphorylation of filamin A on an important regulatory site. *Mol Cell Biol* **24**, 3025–3035 (2004).
53. Xu, B. E. WNK1 Activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 7826–7831 (2003).
54. Hayashi, M. & Lee, J.-D. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med* **82**, 800–808 (2004).
55. Mulloy, R., Salinas, S., Philips, A. & Hipskind, R. A. Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* **22**, 5387–5398 (2003).

56. RANGANATHAN, A., Pearson, G., CHRESTENSEN, C., STURGILL, T. & COBB, M. The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **449**, 8–16 (2006).
57. Turgeon, B., Saba-El-Leil, M. K. & Meloche, S. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem. J.* **346 Pt 1**, 169–175 (2000).
58. Julien, C. Nuclear Export of ERK3 by a CRM1-dependent Mechanism Regulates Its Inhibitory Action on Cell Cycle Progression. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 42615–42624 (2003).
59. Coulombe, P., Rodier, G., Bonneil, E., Thibault, P. & Meloche, S. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* **24**, 6140–6150 (2004).
60. Cheng, M., Boulton, T. G. & Cobb, M. H. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 8951–8958 (1996).
61. Kant, S. *et al.* Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* **281**, 35511–35519 (2006).
62. Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J. & Meloche, S. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 4542–4558 (2003).
63. Dél  ris, P. *et al.* Activation Loop Phosphorylation of ERK3/ERK4 by Group I p21-activated Kinases (PAKs) Defines a Novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated Protein Kinase 5 Signaling Pathway. *J Biol Chem* **286**, 6470–6478 (2011).
64. Klinger, S. *et al.* Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 16710–16715 (2009).
65. Rousseau, J. *et al.* Targeted Inactivation of Mapk4 in Mice Reveals Specific Nonredundant Functions of Erk3/Erk4 Subfamily Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol Cell Biol* **30**, 5752–5763 (2010).
66. Tanguay, P.-L., Rodier, G. & Meloche, S. C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis. *Biochem. J.* **428**, 103–111 (2010).
67. Seternes, O.-M. *et al.* Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *EMBO J* **23**, 4780–4791 (2004).
68. la Mota-Peynado, De, A., Chernoff, J. & Beeser, A. Identification of the atypical MAPK Erk3 as a novel substrate for p21-activated kinase (Pak) activity. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 13603–13611 (2011).
69. Aberg, E. *et al.* Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* **281**, 35499–35510 (2006).
70. Ni, H., Wang, X. S., Diener, K. & Yao, Z. MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of

- the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**, 492–496 (1998).
71. New, L. *et al.* PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J* **17**, 3372–3384 (1998).
 72. Schumacher, S. *et al.* Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J* **23**, 4770–4779 (2004).
 73. Seternes, O.-M. *et al.* Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress. *Mol Cell Biol* **22**, 6931–6945 (2002).
 74. Shi, Y. *et al.* Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Mol Cell Biol* **23**, 7732–7741 (2003).
 75. Aberg, E. *et al.* Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif. *J Biol Chem* **284**, 19392–19401 (2009).
 76. Gerits, N. *et al.* The transcriptional regulation and cell-specific expression of the MAPK-activated protein kinase MK5. *Cell Mol Biol Lett* **14**, 548–574 (2009).
 77. Dingar, D. *et al.* Characterization of the expression and regulation of MK5 in the murine ventricular myocardium. *Cellular Signalling* **22**, 1063–1075 (2010).
 78. New, L., Jiang, Y. & Han, J. Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2603–2616 (2003).
 79. Sun, P. *et al.* PRAK Is Essential for ras-Induced Senescence and Tumor Suppression. *Cell* **128**, 295–308 (2007).
 80. Gerits, N. *et al.* Modulation of F-actin rearrangement by the cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway is mediated by MAPK-activated protein kinase 5 and requires PKA-induced nuclear export of MK5. *J Biol Chem* **282**, 37232–37243 (2007).
 81. Kotlyarov, A. *et al.* MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- α biosynthesis. *Nat. Cell Biol.* **1**, 94–97 (1999).
 82. Abe, M. K., Kuo, W. L., Hershenson, M. B. & Rosner, M. R. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* **19**, 1301–1312 (1999).
 83. Abe, M. K. ERK8, a New Member of the Mitogen-activated Protein Kinase Family. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 16733–16743 (2002).
 84. Abe, M. K. ERK7 Is an Autoactivated Member of the MAPK Family. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 21272–21279 (2001).
 85. Kuo, W. L. ERK7 Expression and Kinase Activity Is Regulated by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 23073–23081 (2004).
 86. Klevernic, I. V. *et al.* Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *Biochem. J.* **394**, 365 (2006).
 87. Saelzler, M. P. *et al.* ERK8 down-regulates transactivation of the glucocorticoid receptor through Hic-5. *J Biol Chem* **281**, 16821–16832 (2006).

88. Henrich, L. M. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Mol Cell Biol* **23**, 5979–5988 (2003).
89. Brott, B. K., Pinsky, B. A. & Erikson, R. L. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 963–968 (1998).
90. Ohkawara, B. *et al.* Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction. *Genes & Development* **18**, 381–386 (2004).
91. Kanei-Ishii, C. *et al.* Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes & Development* **18**, 816–829 (2004).
92. Kojima, H. *et al.* STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 4524–4529 (2005).
93. Ishitani, T. *et al.* The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**, 798–802 (1999).
94. Smit, L. Wnt Activates the Tak1/Nemo-like Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 17232–17240 (2004).
95. Labrecque, N., Baldwin, T. & Lesage, S. Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection. *Immunology and cell biology* (2010).doi:10.1038/icb.2010.119
96. Jenkinson, W. E. *et al.* Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur J Immunol* **37**, 2090–2096 (2007).
97. Kawakami, N. *et al.* Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the fetal thymus. *J Immunol* **163**, 3211–3216 (1999).
98. Liu, C. *et al.* Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* **108**, 2531–2539 (2006).
99. Gossens, K. *et al.* Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via SIP-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 761–778 (2009).
100. Zlotoff, D. A. *et al.* CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* **115**, 1897–1905 (2010).
101. Scimone, M. L., Aifantis, I., Apostolou, I., Boehmer, von, H. & Andrian, von, U. H. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7006–7011 (2006).
102. Bell, J. J. & Bhandoola, A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* **452**, 764–767 (2008).
103. Chi, A. W., Bell, J. J., Zlotoff, D. A. & Bhandoola, A. Untangling the T branch of the hematopoiesis tree. *Curr Opin Immunol* **21**, 121–126 (2009).
104. Bhandoola, A., Boehmer, von, H., Petrie, H. T. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Commitment and Developmental Potential of Extrathymic and Intrathymic T Cell Precursors: Plenty to Choose from. *Immunity* **26**, 678–689 (2007).
105. Wada, H. *et al.* Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* **452**, 768–772 (2008).

106. Carpenter, A. C. & Bosselut, R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* **11**, 666–673 (2010).
107. Rothenberg, E. V., Moore, J. E. & Yui, M. A. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* **8**, 9–21 (2008).
108. Radtke, F., Wilson, A., Ernst, B. & MacDonald, H. R. The role of Notch signaling during hematopoietic lineage commitment. *Immunol Rev* **187**, 65–74 (2002).
109. Allman, D., Aster, J. C. & Pear, W. S. Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev* **187**, 75–86 (2002).
110. Radtke, F., Fasnacht, N. & MacDonald, H. R. Notch Signaling in the Immune System. *Immunity* **32**, 14–27 (2010).
111. Wilson, A., MacDonald, H. R. & Radtke, F. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* **194**, 1003–1012 (2001).
112. Allman, D. *et al.* Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med* **194**, 99–106 (2001).
113. Pui, J. C. *et al.* Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**, 299–308 (1999).
114. Radtke, F. *et al.* Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547–558 (1999).
115. Koch, U. *et al.* Subversion of the T/B lineage decision in the thymus by lunatic fringe-mediated inhibition of Notch-1. *Immunity* **15**, 225–236 (2001).
116. Schmitt, T. M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* **17**, 749–756 (2002).
117. Born, W. K., Reardon, C. L. & O'Brien, R. L. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **18**, 31–38 (2006).
118. Hayes, S. M., Li, L. & Love, P. E. TCR Signal Strength Influences $\alpha\beta/\gamma\delta$ Lineage Fate. *Immunity* **22**, 583–593 (2005).
119. Hayes, S. M. & Love, P. E. A retrospective on the requirements for gammadelta T-cell development. *Immunol Rev* **215**, 8–14 (2007).
120. Ciofani, M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development. *Nat Rev Immunol* **10**, 657–663 (2010).
121. Haks, M. C. *et al.* Attenuation of $\gamma\delta$ TCR Signaling Efficiently Diverts Thymocytes to the $\alpha\beta$ Lineage. *Immunity* **22**, 595–606 (2005).
122. Schatz, D. G., Oettinger, M. A. & Baltimore, D. *Pillars article: the V(D)J recombination activating gene, RAG-1. 1989. J. Immunol.* **180**, 5–18 (2008).
123. Market, E. & Papavasiliou, F. N. V(D)J Recombination and the Evolution of the Adaptive Immune System. *Plos Biol* **1**, e6 (2003).
124. Oettinger, M. A. How to keep V(D)J recombination under control. *Immunol Rev* **200**, 165–181 (2004).
125. Sadofsky, M. J. Recombination-activating gene proteins: more regulation, please. *Immunol Rev* **200**, 83–89 (2004).
126. Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517–1523 (1990).

127. Steen, S. B., Gomelsky, L. & Roth, D. B. The 12/23 rule is enforced at the cleavage step of V(D)J recombination in vivo. *Genes Cells* **1**, 543–553 (1996).
128. Thomas, J. O. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 395–401 (2001).
129. Lu, C. P., Posey, J. E. & Roth, D. B. Understanding how the V(D)J recombinase catalyzes transesterification: distinctions between DNA cleavage and transposition. *Nucleic Acids Research* **36**, 2864–2873 (2008).
130. Roth, D. B. Restraining the V(D)J recombinase. *Nat Rev Immunol* **3**, 656–666 (2003).
131. Bassing, C. H., Swat, W. & Alt, F. W. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl**, S45–55 (2002).
132. Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 712–720 (2003).
133. Yano, K.-I., Morotomi-Yano, K. & Akiyama, H. Cernunnos/XLF: a new player in DNA double-strand break repair. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1237–1240 (2009).
134. Boehmer, von, H. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* **5**, 571–577 (2005).
135. Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C. & Boehmer, von, H. Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* **375**, 795–798 (1995).
136. Dave, V. P. Hierarchical role of CD3 chains in thymocyte development. *Immunol Rev* **232**, 22–33 (2009).
137. Yamasaki, S. *et al.* Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat Immunol* **7**, 67–75 (2005).
138. Miosge, L. & Zamoyska, R. Signalling in T-cell development: is it all location, location, location? *Curr Opin Immunol* **19**, 194–199 (2007).
139. Janas, M. L. *et al.* Thymic development beyond β -selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 247–261 (2010).
140. Trampont, P. C. *et al.* CXCR4 acts as a costimulator during thymic β -selection. *Nat Immunol* **11**, 162–170 (2009).
141. Maillard, I. *et al.* The requirement for Notch signaling at the β -selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 2239–2245 (2006).
142. Ciofani, M., Knowles, G. C., Wiest, D. L., Boehmer, von, H. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Stage-Specific and Differential Notch Dependency at the $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Lineage Bifurcation. *Immunity* **25**, 105–116 (2006).
143. Ma, A. *et al.* Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4763–4767 (1995).
144. Yélamos, J. *et al.* PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. *EMBO J* **25**, 4350–4360 (2006).
145. Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H. & Held, W. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol* **2**, 691–

- 697 (2001).
146. Sun, Z. Requirement for RORgamma in Thymocyte Survival and Lymphoid Organ Development. *Science* **288**, 2369–2373 (2000).
 147. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C. & de Murcia, G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 517–528 (2006).
 148. Puebla-Osorio, N. & Zhu, C. DNA damage and repair during lymphoid development: antigen receptor diversity, genomic integrity and lymphomagenesis. *Immunol Res* **41**, 103–122 (2008).
 149. San José, E., Sahuquillo, A. G., Bragado, R. & Alarcón, B. Assembly of the TCR/CD3 complex: CD3 epsilon/delta and CD3 epsilon/gamma dimers associate indistinctly with both TCR alpha and TCR beta chains. Evidence for a double TCR heterodimer model. *Eur J Immunol* **28**, 12–21 (1998).
 150. Malissen, B. CD3 ITAMs count! *Nat Immunol* **9**, 583–584 (2008).
 151. Ferguson, B. V. & Ostergaard, H. L. CD45 regulates thymocyte survival during development in fetal thymic organ culture. *Immunobiology* **215**, 458–465 (2010).
 152. Zikherman, J. *et al.* CD45-Csk phosphatase-kinase titration uncouples basal and inducible T cell receptor signaling during thymic development. *Immunity* **32**, 342–354 (2010).
 153. Lin, J. & Weiss, A. T cell receptor signalling. *J. Cell. Sci.* **114**, 243–244 (2001).
 154. Ruland, J. & Mak, T. W. Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol Rev* **193**, 93–100 (2003).
 155. Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 139–176 (2003).
 156. Surh, C. D. & Sprent, J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* **372**, 100–103 (1994).
 157. Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P. & Boehmer, von, H. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* **66**, 533–540 (1991).
 158. Wiest, D. L. *et al.* A spontaneously arising mutation in the DLAARN motif of murine ZAP-70 abrogates kinase activity and arrests thymocyte development. *Immunity* **6**, 663–671 (1997).
 159. Negishi, I. *et al.* Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* **376**, 435–438 (1995).
 160. Chan, A. C. *et al.* ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* **264**, 1599–1601 (1994).
 161. Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A. & Roifman, C. M. Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* **76**, 947–958 (1994).
 162. Saini, M. *et al.* Regulation of Zap70 expression during thymocyte development enables temporal separation of CD4 and CD8 repertoire selection at different signaling thresholds. *Science Signaling* **3**, ra23 (2010).
 163. Alegre, M. L., Frauwirth, K. A. & Thompson, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* **1**, 220–228 (2001).
 164. Nitta, T. *et al.* Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of

- CD8⁺ T cells. *Immunity* **32**, 29–40 (2010).
165. Klein, L., Hinterberger, M., Wirtsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* **9**, 833–844 (2009).
 166. Nakagawa, T. Cathepsin L: Critical Role in Ii Degradation and CD4 T Cell Selection in the Thymus. *Science* **280**, 450–453 (1998).
 167. Daniels, M. A. *et al.* Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* **444**, 724–729 (2006).
 168. Dzhagalov, I., Dunkle, A. & He, Y. W. The anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 promotes T lymphocyte survival at multiple stages. *J Immunol* **181**, 521–528 (2008).
 169. Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., Draper, D. & He, Y. W. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res.* **15**, 749–769 (2005).
 170. Stritesky, G. L., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Selection of Self-Reactive T Cells in the Thymus. *Annu. Rev. Immunol.* (2011).doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075035
 171. Palmer, E. Cell death and immunity: Negative selection — clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* **3**, 383–391 (2003).
 172. Hogquist, K. A., Baldwin, T. A. & Jameson, S. C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* **5**, 772–782 (2005).
 173. McGargill, M. A., Derbinski, J. M. & Hogquist, K. A. Receptor editing in developing T cells. *Nat Immunol* **1**, 336–341 (2000).
 174. Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R. & Thompson, C. B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & Development* **15**, 1481–1486 (2001).
 175. McCarty, N. *et al.* Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat Immunol* **6**, 65–72 (2004).
 176. Woronicz, J. D. *et al.* Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **15**, 6364–6376 (1995).
 177. Cheng, L. E., Chan, F. K., Cado, D. & Winoto, A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* **16**, 1865–1875 (1997).
 178. Priatel, J. J., Chen, X., Dhanji, S., Abraham, N. & Teh, H.-S. RasGRP1 transmits prodifferentiation TCR signaling that is crucial for CD4 T cell development. *J Immunol* **177**, 1470–1480 (2006).
 179. Fischer, A. *et al.* ZAP70: a master regulator of adaptive immunity. *Semin Immunopathol* **32**, 107–116 (2010).
 180. Lesourne, R. *et al.* Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol* **10**, 840–847 (2009).
 181. Shen, S., Zhu, M., Lau, J., Chuck, M. & Zhang, W. The essential role of LAT in thymocyte development during transition from the double-positive to single-positive stage. *J Immunol* **182**, 5596–5604 (2009).
 182. Houtman, J. C. D. *et al.* Binding Specificity of Multiprotein Signaling Complexes Is Determined by Both Cooperative Interactions and Affinity Preferences †. *Biochemistry* **43**, 4170–4178 (2004).

183. Zhu, M., Janssen, E. & Zhang, W. Minimal requirement of tyrosine residues of linker for activation of T cells in TCR signaling and thymocyte development. *J Immunol* **170**, 325–333 (2003).
184. Singer, A., Adoro, S. & Park, J.-H. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* **8**, 788–801 (2008).
185. Germain, R. N. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309–322 (2002).
186. Brugnera, E. *et al.* Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* **13**, 59–71 (2000).
187. Hernández-Hoyos, G., Anderson, M. K., Wang, C., Rothenberg, E. V. & Alberola-Ila, J. GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation. *Immunity* **19**, 83–94 (2003).
188. Wang, L. & Bosselut, R. CD4-CD8 lineage differentiation: Thpok-ing into the nucleus. *J Immunol* **183**, 2903–2910 (2009).
189. He, X., Park, K. & Kappes, D. J. The Role of ThPOK in Control of CD4/CD8 Lineage Commitment. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 295–320 (2010).
190. Setoguchi, R. *et al.* Repression of the Transcription Factor Th-POK by Runx Complexes in Cytotoxic T Cell Development. *Science* **319**, 822–825 (2008).
191. Hu, Q., Sader, A., Parkman, J. C. & Baldwin, T. A. Bim-Mediated Apoptosis Is Not Necessary for Thymic Negative Selection to Ubiquitous Self-Antigens. *J Immunol* **183**, 7761–7767 (2009).
192. Guo, J. *et al.* Regulation of the TCR α repertoire by the survival window of CD4+CD8+ thymocytes. *Nat Immunol* **3**, 469–476 (2002).
193. Cibotti, R., Punt, J. A., Dash, K. S., Sharrow, S. O. & Singer, A. Surface molecules that drive T cell development in vitro in the absence of thymic epithelium and in the absence of lineage-specific signals. *Immunity* **6**, 245–255 (1997).
194. Groves, T., Parsons, M., Miyamoto, N. G. & Guidos, C. J. TCR engagement of CD4+CD8+ thymocytes in vitro induces early aspects of positive selection, but not apoptosis. *J Immunol* **158**, 65–75 (1997).
195. Nitta, T., Nitta, S., Lei, Y., Lipp, M. & Takahama, Y. CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 17129–17133 (2009).
196. Bröker, L. E., Krüyt, F. A. E. & Giaccone, G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3155–3162 (2005).
197. Kroemer, G. & Martin, S. J. Caspase-independent cell death. *Nat Med* **11**, 725–730 (2005).
198. Hu, T., Simmons, A., Yuan, J., Bender, T. P. & Alberola-Ila, J. The transcription factor c-Myb primes CD4+CD8+ immature thymocytes for selection into the iNKT lineage. *Nat Immunol* **11**, 435–441 (2010).
199. Cao, Y. *et al.* The serine/threonine kinase LKB1 controls thymocyte survival through regulation of AMPK activation and Bcl-XL expression. *Cell Res.* 99–108 (2009).doi:10.1038/cr.2009.141
200. Wang, R. *et al.* T Cell Factor 1 Regulates Thymocyte Survival via a ROR t-

- Dependent Pathway. *J Immunol* (2011).doi:10.4049/jimmunol.1101205
201. Albu, D. I. *et al.* BCL11B is required for positive selection and survival of double-positive thymocytes. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 3003–3015 (2007).
202. Kasler, H. G. & Verdin, E. Histone Deacetylase 7 Functions as a Key Regulator of Genes Involved in both Positive and Negative Selection of Thymocytes. *Mol Cell Biol* **27**, 5184–5200 (2007).
203. Jang, I. K. *et al.* Grb2 functions at the top of the T-cell antigen receptor-induced tyrosine kinase cascade to control thymic selection. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 10620–10625 (2010).
204. Kasler, H. G. *et al.* Histone Deacetylase 7 Regulates Cell Survival and TCR Signaling in CD4/CD8 Double-Positive Thymocytes. *J Immunol* **186**, 4782–4793 (2011).
205. Marquis, Miriam. *Étude du rôle de la MAP kinase non-conventionnelle ERK3 dans le développement thymique et l'activation des lymphocytes T.* Thèse de Doctorant, Université de Montréal, Montréal, 2009, 223 pages.
206. Kostenko, S., Dumitriu, G. & Moens, U. Tumour promoting and suppressing roles of the atypical MAP kinase signalling pathway ERK3/4-MK5. *J Mol Sign* **7**, 1–1 (2012).
207. Brand, F. *et al.* The Extracellular Signal-Regulated Kinase 3 (Mitogen-Activated Protein Kinase 6 [MAPK6])-MAPK-Activated Protein Kinase 5 Signaling Complex Regulates Septin Function and Dendrite Morphology. *Mol Cell Biol* **32**, 2467–2478 (2012).
208. MacDonald, H. R., Wilson, A. & Radtke, F. Notch1 and T-cell development: insights from conditional knockout mice. *Trends in Immunology* 1–6 (2001).
209. Arosio, D. Fluorescence Anisotropy Studies on the Ku-DNA Interaction: Anion and Cation Effects. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 42826–42835 (2004).
210. Pitcher, L. A. *et al.* The formation and functions of the 21- and 23-kDa tyrosine-phosphorylated TCR zeta subunits. *Immunol Rev* **191**, 47–61 (2003).
211. Hermiston, M. L., Xu, Z. & Weiss, A. CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 107–137 (2003).
212. Rossy, J., Williamson, D. J. & Gaus, K. How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front Immunol* **3**, 167 (2012).
213. Fassett, M. S., Jiang, W., D'Alise, A. M., Mathis, D. & Benoist, C. Nuclear receptor Nr4a1 modulates both regulatory T-cell (Treg) differentiation and clonal deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 3891–3896 (2012).
214. Ashton-Rickardt, P. G. *et al.* Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* **76**, 651–663 (1994).
215. Alberola-Ila, J., Hogquist, K. A., Swan, K. A., Bevan, M. J. & Perlmutter, R. M. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* **184**, 9–18 (1996).
216. Robey, E. A. *et al.* Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell* **64**, 99–107 (1991).

217. Jetten, A. M. & Ueda, E. Retinoid-related orphan receptors (RORs): roles in cell survival, differentiation and disease. *Cell Death Differ* **9**, 1167–1171 (2002).
218. Lawless, C. *et al.* Quantitative assessment of markers for cell senescence. *EXG* **45**, 772–778 (2010).
219. Deleris, P. *et al.* Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J. Cell. Physiol.* **217**, 778–788 (2008).
220. Patrick, M. S. *et al.* Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 16345–16350 (2009).
221. Gu, Y. *et al.* RhoH GTPase recruits and activates Zap70 required for T cell receptor signaling and thymocyte development. *Nat Immunol* **7**, 1182–1190 (2006).
222. Chae, H.-D., Siefiring, J. E., Hildeman, D. A., Gu, Y. & Williams, D. A. RhoH Regulates Subcellular Localization of ZAP-70 and Lck in T Cell Receptor Signaling. *PLoS ONE* **5**, e13970 (2010).
223. Bustelo, X. R. Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* **20**, 6372–6381 (2001).
224. Bustelo, X. R. Understanding Rho/Rac biology in T-cells using animal models. *Bioessays* **24**, 602–612 (2002).
225. Na, S. *et al.* Expression of activated CDC42 induces T cell apoptosis in thymus and peripheral lymph organs via different pathways. *Oncogene* **18**, 7966–7974 (1999).
226. Dumont, C. *et al.* Rac GTPases play critical roles in early T-cell development. *Blood* **113**, 3990–3998 (2009).
227. Bishop, A. L. & Hall, A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348 Pt 2**, 241–255 (2000).
228. van Ewijk, W., Holländer, G., Terhorst, C. & Wang, B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* **127**, 1583–1591 (2000).
229. Petrie, H. T. *et al.* Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med* **178**, 615–622 (1993).
230. Fujikawa, K. *et al.* Vav1/2/3-null Mice Define an Essential Role for Vav Family Proteins in Lymphocyte Development and Activation but a Differential Requirement in MAPK Signaling in T and B Cells. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 1595–1608 (2003).
231. Sato, Y. *et al.* Rac GTPases are involved in development, survival and homeostasis of T cells. *Immunology Letters* **124**, 27–34 (2009).

CHAPITRE 6. ANNEXE

(résultats non-publiés)

Annexe I

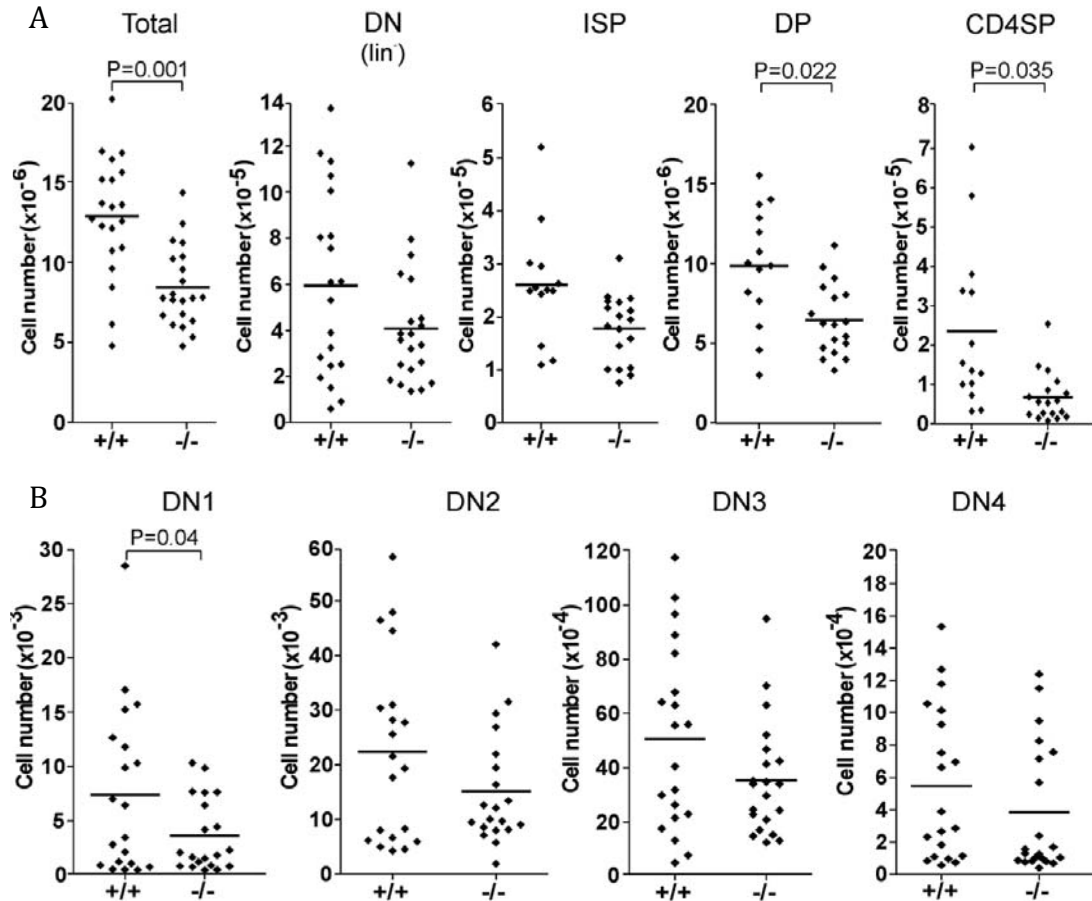


Figure 35. Cellularité réduite et différenciation défectueuse des thymocytes CD4SP chez la souris *Erk3*^{-/-} nouveau-nés. (A) Réduction du nombre de thymocytes DP et de thymocytes CD4SP en absence d'ERK3. Les nombres cellulaires pour les différentes populations de thymocytes sont indiqués pour les souris nouveaux-nées *Erk3*^{+/+} (+/+) et *Erk3*^{-/-} (-/-). Le trait représente la valeur moyenne, chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées par analyse de variance (ANOVA). (B) Réduction du nombre de thymocytes DN1 en absence de ERK3. Les nombres cellulaires pour les différentes populations de thymocytes sont indiqués pour les souris nouveaux-nées *Erk3*^{+/+} (+/+) et *Erk3*^{-/-} (-/-). Le trait représente la valeur moyenne, chaque point représente une souris. Les différences statistiques ont été déterminées par analyse de variance (ANOVA). Tire de ²⁰⁵.

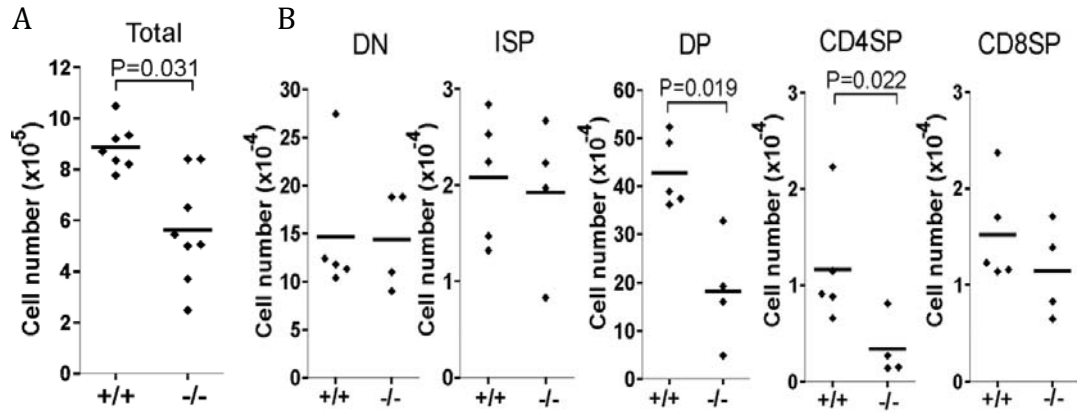


Figure 36. Le défaut du développement thymique en absence d'ERK3 est intrinsèque au thymus. (A) Réduction de la cellularité totale thymique des FTOCs $Erk3^{-/-}$. Le nombre de thymocytes récupérés à la fin de la culture est représenté pour des FTOCs $Erk3^{+/+}$ (+/+) et $Erk3^{-/-}$ (-/-). Les différences statistiques ont été déterminées par analyse de variance (ANOVA). (B) Réduction du nombre de thymocytes DP et CD4SP dans les FTOCs $Erk3^{-/-}$. Les nombres de cellules pour les différentes populations de thymocytes sont indiqués pour les FTOCs $Erk3^{+/+}$ (+/+) et $Erk3^{-/-}$ (-/-). Les différences statistiques ont été déterminées par analyse de variance (ANOVA). Tire de ²⁰⁵.

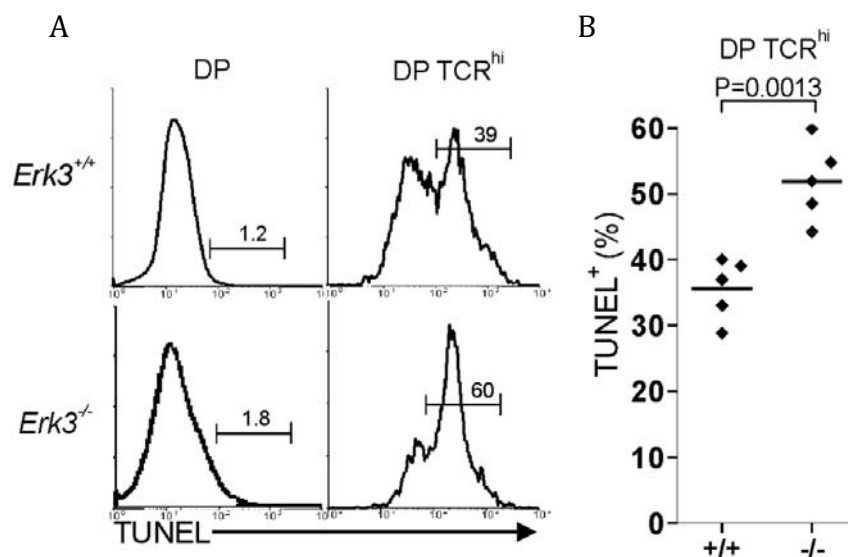


Figure 37. Augmentation de l'apoptose des thymocytes DP chez les souris *Erk3*^{-/-}. (A) Apoptose accrue des thymocytes DP sélectionnés positivement en absence d'ERK3. Les histogrammes montrent un marquage cellulaire TUNEL dans les thymocytes DP totales (DP) et dans les thymocytes DP RCT^{fort} en présence (en haut) ou l'absence (en bas) d'ERK3. Le pourcentage de cellules TUNEL⁺ est indiqué sur chaque histogramme. (B) Quantification de l'apoptose chez les thymocytes DP RCT^{fort}. Le pourcentage de cellules TUNEL⁺ pour la population RCT^{fort} est indiqué pour les thymocytes DP *Erk3*^{+/+} et *Erk3*^{-/-}. Chaque point représente une souris et la barre indique la valeur moyenne. Les différences statistiques ont été déterminées par analyse de variance (ANOVA). Tire de ²⁰⁵.

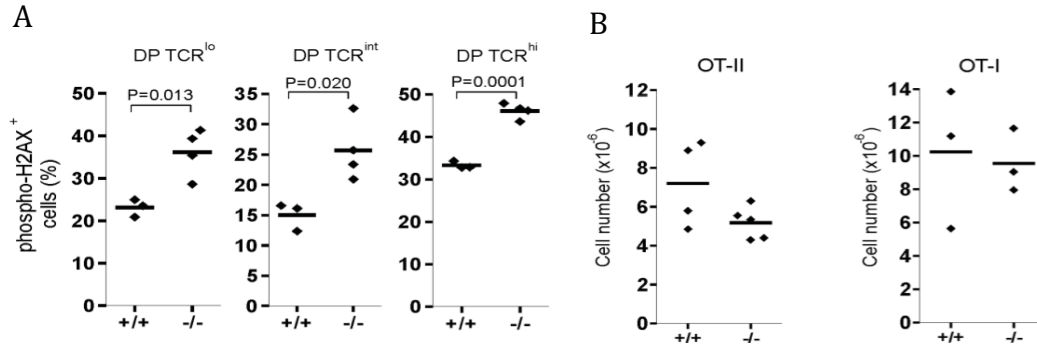


Figure 38. Accumulation des bris double brin de l'ADN chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}. (A) Quantification des bris double brin d'ADN chez les thymocytes DP *Erk3*^{-/-}. Le pourcentage de cellules phospho-H2AX positives dans les différentes sous-populations thymocytes DP (RCT faible, intermédiaire et fort) sont indiquées pour les souris nouveau-nées *Erk3*^{+/+} (+/+) et *Erk3*^{-/-} (-/-). Chaque point représente une souris et la barre est la valeur moyenne. Les différences statistiques ont été déterminées par le test de Student. (B) Restauration de la cellularité thymique en absence de RAG dans les souris *Erk3*^{-/-}. La cellularité thymique de souris nouveau-nés OT-II/*Rag-2*^{-/-} (à gauche) et OT-I/*Rag-2*^{-/-} (à droite) compétentes (+/+) ou déficientes (-/-) pour ERK3 est montrée. Tire de ²⁰⁵.



11200 Rockville Pike
Suite 302
Rockville, Maryland 20852

August 19, 2011

American Society for Biochemistry and Molecular Biology

To whom it may concern,

It is the policy of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology to allow reuse of any material published in its journals (the Journal of Biological Chemistry, Molecular & Cellular Proteomics and the Journal of Lipid Research) in a thesis or dissertation at no cost and with no explicit permission needed. Please see our copyright permissions page on the journal site for more information.

Best wishes,

Sarah Crespi

[American Society for Biochemistry and Molecular Biology](#)

11200 Rockville Pike, Rockville, MD

Suite 302

240-283-6616

[JBC](#) | [MCP](#) | [JLR](#)

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 12, 2013

This is a License Agreement between Julien Sirois ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3126601260108
License date	Apr 12, 2013
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Immunology and Cell Biology
Licensed content title	Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection
Licensed content author	Nathalie Labrecque, Troy Baldwin and Sylvie Lesage
Licensed content date	Oct 19, 2010
Volume number	89
Issue number	1
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Le rôle de la MAPK non-conventionnelle ERK3 dans le développement thymique
Expected completion date	Apr 2013
Estimated size (number of pages)	155
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this

material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME],
advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL
ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK500998732.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Title: Activation and Function of the
MAPKs and Their Substrates, the
MAPK-Activated Protein Kinases

Author: Marie Cargnello, Philippe P.
Roux

Publication: Microbiology and Molecular
Biology Reviews

Publisher: American Society for
Microbiology

Date: Mar 1, 2011

Logged in as:
Julien Sirois

LOGOUT

Copyright © 2011, American Society for Microbiology

Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

BACK

CLOSE WINDOW

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 12, 2013

This is a License Agreement between Julien Sirois ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3126621197903
License date	Apr 12, 2013
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Immunology
Licensed content title	Launching the T-cell-lineage developmental programme
Licensed content author	Ellen V. Rothenberg, Jonathan E. Moore and Mary A. Yui
Licensed content date	Jan 1, 2008
Volume number	8
Issue number	1
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1 Stages in early T-cell development.
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Le rôle de la MAPK non-conventionnelle ERK3 dans le développement thymique
Expected completion date	Apr 2013
Estimated size (number of pages)	155
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this

material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME],
advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL
ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK500998767.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customer care@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 12, 2013

This is a License Agreement between Julien Sirois ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3126621294761
License date	Apr 12, 2013
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Immunology
Licensed content title	Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice
Licensed content author	Alfred Singer, Stanley Adoro and Jung-Hyun Park
Licensed content date	Oct 1, 2008
Volume number	8
Issue number	10
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 3. The kinetic signalling model of CD4/CD8 lineage choice
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Le rôle de la MAPK non-conventionnelle ERK3 dans le développement thymique
Expected completion date	Apr 2013
Estimated size (number of pages)	155
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME],
advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL
ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK500998769.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.
